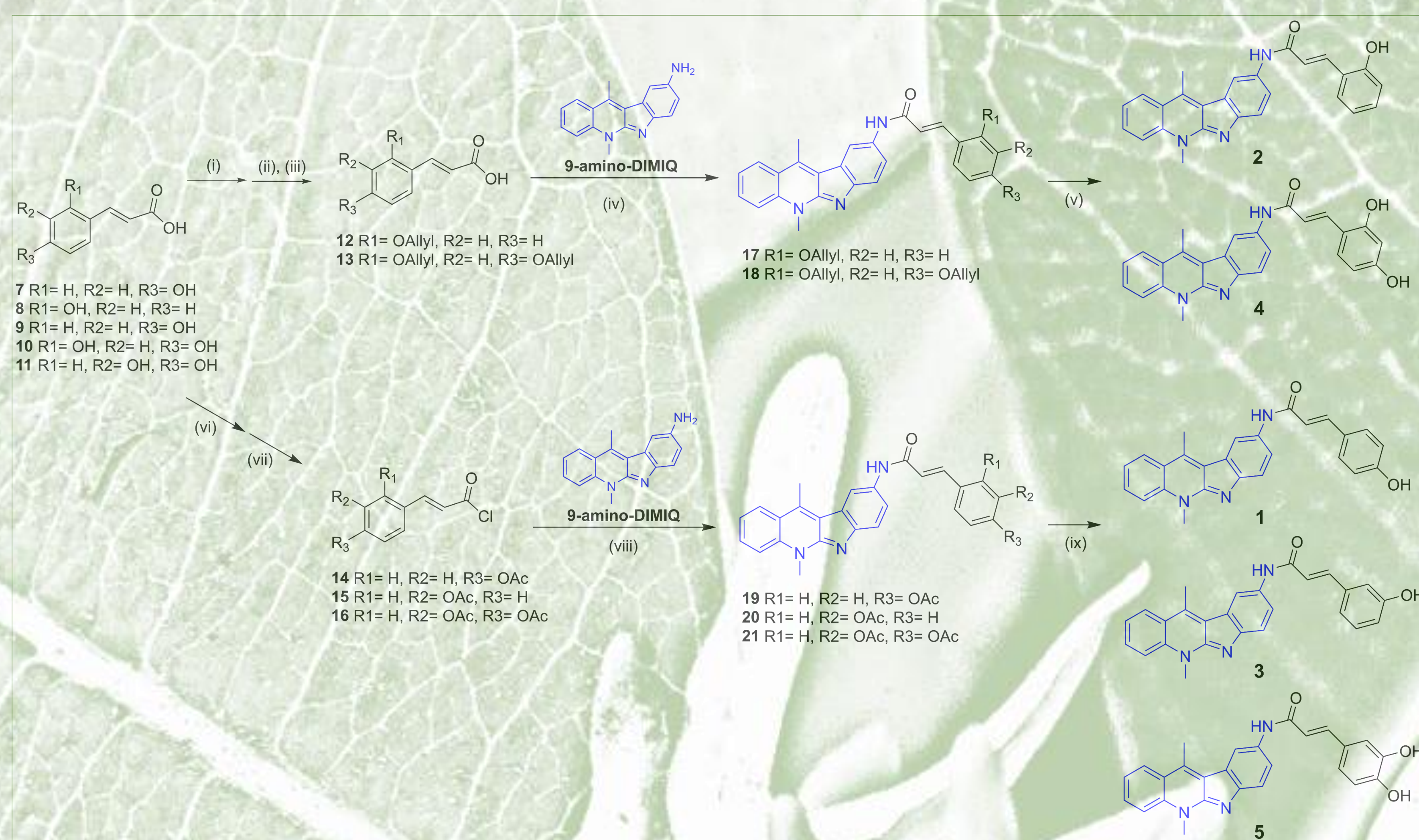


Marcin Cybulski¹, Katarzyna Sidoryk¹, Magdalena Zaremba-Czogalla², Bartosz Trzaskowski³, Marek Kubiszewski¹, Joanna Tobiasz¹, Anna Jaromin², Olga Michalak^{1,*}

Stosowanie w terapii kombinacji chemioterapeutyków o różnym mechanizmie działania jest powszechne w leczeniu onkologicznym. W niektórych typach nowotworów ciągle istnieje potrzeba przezwyciężenia ograniczeń w leczeniu, również w przypadku stosowania celowanej terapii skojarzonej. W przypadku raka trzustki nawet wprowadzenie w 2011 r. terapii wielolekowej Folfirinox (kwas folinowy, 5-fluorouracyl, irynotekan, oksaliplatyna) nie przyniosło zadowalających wyników w zakresie wskaźnika przeżycia. Badanie związków hybrydowych jest jedną ze skuteczniejszych strategii w obszarze poszukiwania nowych leków. Hybrydy te można zaklasyfikować do jednego z trzech podstawowych typów: połączonych linkerem (linked), bezpośrednio połączonych (fused) lub o nakładających się strukturach (merged). Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, zaprojektowano, otrzymano, zbadano metodami *in silico* oraz w testach *in vitro* nowe amidowe koniugaty 5,11-dimetylo-5*H*-indolo[2,3-*b*]chinoliny (DiMIQ, **6**) (interkalator DNA, analog neokryptolepiny) z wybranymi naturalnymi kwasami hydroksycynamonowymi, modulatorami ROS.



Rysunek 1. Warunki reakcji: (i) CH₃OH, CH₃COCl, r.t.; (ii) bromek allilowy, K₂CO₃, aceton, r.t.; (iii) NaOH, H₂O/ MeOH; (iv) TBTU, DIPEA, DMF, r.t.; (v) Et₃SiH, Pd(PPh₃)₄, DMF, r.t.; (vi) pirydyna, DMAP, (CH₃CO)₂O; (vii) SOCl₂, DCM; (viii) DCM, pirydyna, -20 do -5°C, następnie do r.t.; (ix) K₂CO₃, DMF, r.t.

Synteza koniugatów

Zabezpieczone pochodne *O*-acetylowe oraz *O*-allilowe kwasów hydroksycynamonowych otrzymano w standardowych warunkach (Rysunek 1): *O*-acylowe pochodne HCA w reakcji z bezwodnikiem octowym w pirydynie, pochodne *O*-allilowe w trzyetapowej procedurze obejmującej estryfikację metanolem, allilowanie bromkiem allilowym i hydrolizę w warunkach zasadowych. Pochodne *O*-allilowe sprzęgano następnie z 9-amino-DiMIQ w obecności odczynnika sprzęgającego TBTU otrzymując zabezpieczone koniugaty z wydajnością 68–75%. Sprzęganie pochodnych *O*-acetylowych przebiegało z niższą wydajnością. Z tego względu przekształcono je ilościowo w odpowiednie chlorki kwasowe za pomocą chlorku tionylu i poddano reakcji *N*-alkilowania z 9-amino-DiMIQ. Zabezpieczenia z otrzymanych koniugatów usunięto w warunkach zasadowych w reakcji z K₂CO₃ otrzymując związki **1**, **3**, **5**. Zabezpieczenia typu eterów allilowych usuwano za pomocą tetrakis(trifenylfosfino)palladu, w obecności trietylosilanu – akceptora wolnych rodników – otrzymując związki **2**, **4**. Związki pośrednie i końcowe oczyszczano chromatograficznie, potwierdzając wszystkie struktury metodami spektroskopowymi: HRMS oraz ¹H, ¹³C, 2D NMR [1].

Badania *in vitro*

Koniugaty **1–5** oraz związek referencyjny (DiMIQ) zostały zbadane pod kątem aktywności cytotoksycznej *in vitro* przeciwko przerzutowemu AsPC-1 i pierwotnemu rakowi trzustki BxPC-3, linii komórkowej raka piersi MCF-7, linii komórkowej raka szyjki macicy HeLa. Dwa z zaprojektowanych oraz zsyntetyzowanych związków (**1** i **2**) wykazały podobną lub wyższą od DiMIQ aktywność cytotoksyczną wobec obu badanych linii komórkowych raka trzustki (Tabela 1), reagując w sposób zależny od dawki w zakresie stężeń 250 – 4000 nM. W przypadku **2** zaobserwowano również hamowanie wzrostu komórek nowotworowych w hormonozależnej linii raka piersi MCF-7 oraz linii raka szyjki macicy HeLa (Rysunek 2). Dodatkowo, związek **3**, mniej aktywny wobec linii komórkowych BxPC-3 i AsPC-1 niż DiMIQ, wykazał znaczną aktywność przy 2000 nM wobec komórek HeLa.



Literatura

- [1] Cybulski, M. et al., Int J Mol Sci. 2024, 25, 2573.
[2] Lipinski, C. A., Drug Discov Today Technol. 2004, 1, 337.

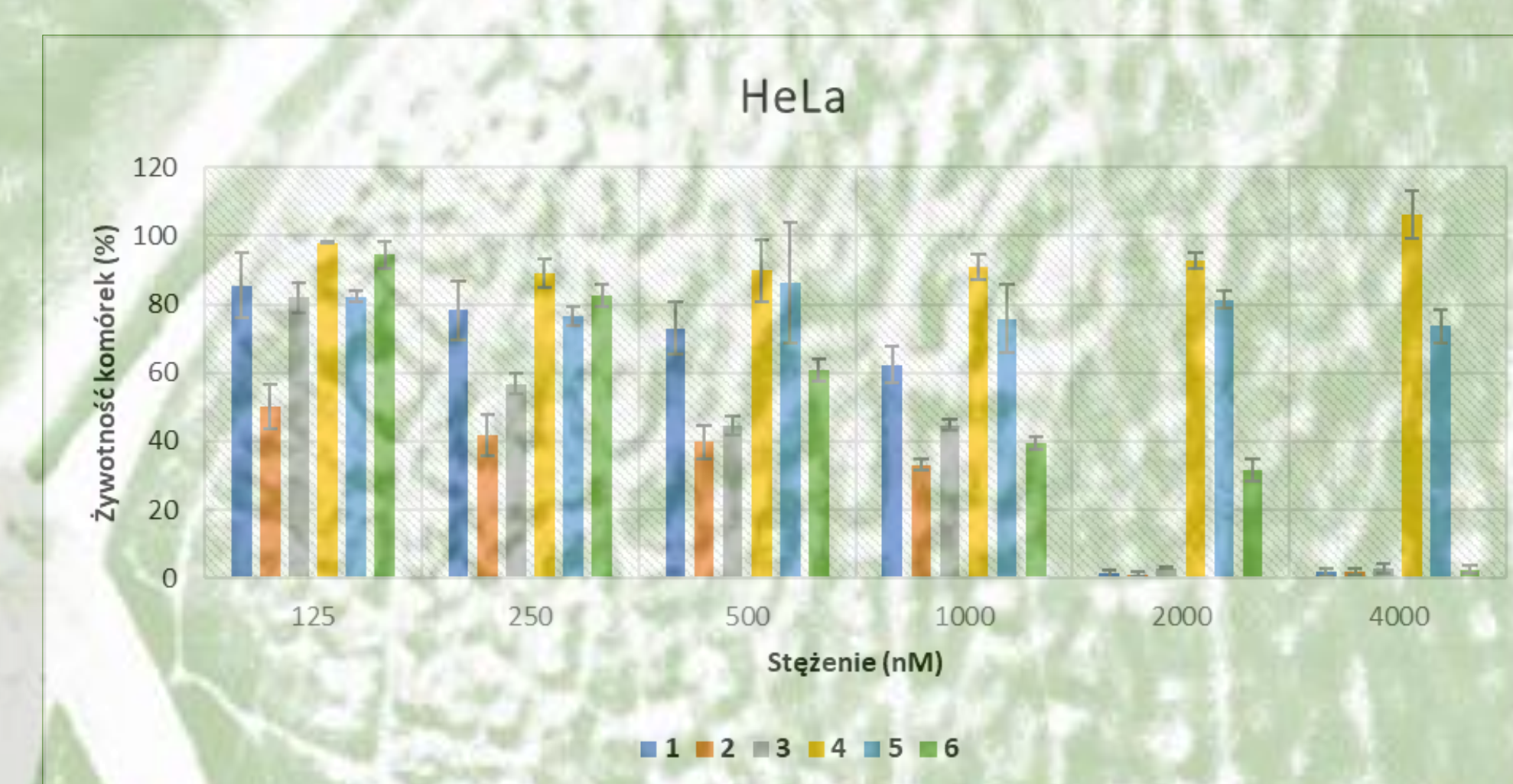
Afilacje autorów

- ¹ Łukasiewicz-Institut Chemii Przemysłowej, ul. Rydygiera 8, Warszawa
² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, ul. Joliot-Curie 14a, Wrocław
³ Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii, ul. Banacha 2c, Warszawa

* olga.michalak@ichp.lukasiewicz.gov.pl

Tabela 1. IC₅₀ oraz wskaźniki selektywności (SI) związków **1** i **2** wobec linii raka trzustki wyznaczone za pomocą testu MTT.

Związek	IC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)	SI	
	AsPC-1	BxPC-3		AsPC-1	BxPC-3
1	2642±287	805±64	2301±158	0,87	2,86
2	337±85	348±52	1714±53	5,09	4,93
DiMIQ	1622±132	889±50	2332±354	1,44	2,62



Rysunek 2. Działanie cytotoksyczne koniugatów **1–5** oraz referencyjnego DiMIQ (**6**) na linię komórkową HeLa. Wyniki wyrażono jako % żywotności.

Normalne ludzkie fibroblasty skóry NHDF zostały wykorzystane jako komórki modelowe do oceny cytotoksyczności *in vitro* związków **1–2**. Związek **2** wpływał na żywotność komórek normalnych w mniejszym stopniu niż na żywotność linii raka trzustki (SI ok. 5), działał też bardziej selektywnie od referencyjnego DiMIQ. Zbadano wpływ **1** oraz **2** na ludzkie krwinki czerwone w stężeniu 1000 nM, wykazując ich znikomą aktywność hemolityczną tj. 0,5% i 1,5% (odpowiednio dla **1** i **2**).

Obliczenia *in silico*

Koniugaty **1–5** mieściły się w limicie masy cząsteczkowej 500 Da, który charakteryzuje układy o dobrej biodostępności po podaniu doustnym. Obliczone profile ADMET koniugatów wykazały, że spełniają one regułę pięciu Lipińskiego [2]. W przypadku reguły trzech Jorgensena naruszony został warunek związany z wartościami rozpuszczalności logS. Dodatkowe przewidywania toksyczności przy użyciu ProTox-II wykazały stosunkowo wysokie wartości LD₅₀, potencjalną immunotoksyczność (z wysokim poziomem ufności) i mutagenność (z umiarkowanym poziomem ufności).

W badaniach bioinformatycznych wykazano, że wszystkie koniugaty mają o ok. jeden rząd wielkości silniejsze wiązanie z DNA oraz o ok. dwa rzędy wielkości silniejsze wiązanie z kompleksem topoizomeraza II–DNA niż referencyjny DiMIQ (**6**).

Podsumowanie

Otrzymano amidowe koniugaty naturalnych kwasów hydroksycynamonowych ze znanym cytostatykiem DiMIQ (**6**) używając dwóch strategii syntetycznych (protekcja-deprotekcja). Koniugaty kwasów *para*- (**1**) oraz *orto*-kumarowego (**2**) wykazały zależną od dawki aktywność przeciwko liniom PDAC. Koniugat **2** okazał się też selektywny względem NHDF z indeksem selektywności 5 oraz kompatybilny z komórkami ludzkiej krwi. Profile ADME wykazały, że związki **1–5** spełniają regułę pięciu Lipińskiego. W badaniu dokowania molekularnego oszacowano różnice w swobodnej energii Gibbsa wiązania **1–5** z DNA jako -8,6 a -9,3 kcal/mol. Były one o 1–2 kcal/mol wyższe od przewidzianych dla DiMIQ. Dokowania do kompleksów topoizomeraza II–DNA wykazały, że w przeciwieństwie do DiMIQ związki **1–5** tworzą szereg silnych oddziaływań z resztami białkowymi topoizomerazy II, co skutkuje wysokimi stałymi wiązania. Dane *in silico* oraz *in vitro*, wskazują związek **2** jako kandydata do dalszych badań biologicznych.

Finansowanie

Projekt zrealizowany w ramach dotacji celowej Prezesa Centrum Łukasiewicz, umowa no. 4/L-ICHP/CL/2021.