

## ZASTOSOWANIE CHEMII „KLIK” DO SYNTEZY BIOKONIUGATÓW SALINOMYCYNY

### APPLICATION OF THE CLICK CHEMISTRY FOR THE SYNTHESIS OF SALINOMYCIN BIOCONJUGATES

**Michał Sulik\*, Michał Antoszczak, Adam Huczyński**

*Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
\*e-mail: micsul@amu.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Salinomycyna jako przedstawiciel antybiotyków jonoforowych

1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa salinomycyny

1.2. Aktywność przeciwnowotworowa salinomycyny

2. Chemia „klik”

3. Zastosowanie chemii „klik” do syntezy biokoniugatów salinomycyny

3.1. Koniugaty z alkaloidami kory chinowca

3.2. Koniugaty z nukleozydami

3.3. Koniugaty z kationem trifenylfosfoniowym

3.4. Homo- i heterodimery antybiotyków jonoforowych

Uwagi końcowe


Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---


**Mgr Michał Sulik** ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2021 roku. W tym samym roku został przyjęty do Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych UAM, gdzie pod kierunkiem prof. dra hab. Adama Huczyńskiego i dra Michała Antoszczaka realizuje swoją pracę doktorską. Dwukrotny laureat stypendium Ministra Edukacji i Nauki oraz laureat konkursu Diamentowy Grant. Jego zainteresowania naukowe związane są z chemiczną modyfikacją związków pochodzenia naturalnego w celu ich potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej lub przeciwdrobnoustrojowej.



 <https://orcid.org/0000-0001-6127-9621>


**Dr Michał Antoszczak** w 2016 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor: prof. dr hab. Adam Huczyński). Od 2017 roku zatrudniony na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Realizował staże naukowe w wiodących europejskich ośrodkach naukowych, takich jak Lund University (Szwecja) oraz Institut Curie w Paryżu (Francja). Laureat stypendiów naukowych, między innymi stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców oraz START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Jego zainteresowania naukowe związane są z chemiczną modyfikacją produktów naturalnych w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej lub przeciwdrobnoustrojowej. Autor blisko 50 publikacji z listy JCR.



 <https://orcid.org/0000-0003-0877-1726>

**Prof. dr hab. Adam Huczyński**, absolwent chemii i fizyki na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Z tą uczelnią związał również swoją karierę zawodową. W 2008 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, w 2013 roku stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych, a w 2019 roku tytuł naukowy profesora. Od 2020 roku jest kierownikiem Zakładu Chemii Medycznej. Wśród jego zainteresowań naukowych są metody modyfikacji związków naturalnych i badanie ich wpływu na aktywność biologiczną. Jest autorem ponad 150 publikacji z listy JCR.



 <https://orcid.org/0000-0003-4770-215X>

## ABSTRACT

Bioconjugation is a well-known method of designing new drug candidates for many different diseases, including cancer. The idea of the process is to join two or more bioactive molecules by means of a covalent bond. Thus, obtained hybrids often exhibit higher efficiency compared to that of the starting compounds. Recently, the use of click chemistry, especially Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, has attracted much attention for the synthesis of bioconjugates of natural compounds. The great advantage of this reaction is its high yield and enzymatic stability of the 1,2,3-triazole ring. Mild conditions of this reaction guarantee that it can be used to modify compounds with low stability, such as salinomycin – a representative of ionophore antibiotics.

Salinomycin is a naturally occurring lipophilic compound isolated from *Streptomyces albus*. It is capable of forming complexes with metal cations and transport them across the lipid membranes. This process disturbs the intercellular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  concentration gradient and leads to apoptosis (programmed cell death). Salinomycin exhibits high anticancer activity, including efficiency against multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells of different origin. Chemical modification of the salinomycin skeleton to increase its biological activity is a very interesting research direction.

Our review article is focused on the application of click chemistry for the synthesis of salinomycin bioconjugates with many different biologically active compounds (*Cinchona* alkaloids, nucleosides, triphenylphosphonium cation, betulinic acid and other ionophore antibiotics). Some of the obtained hybrids exhibit higher efficiency compared to that of the starting compounds, e.g., increased anticancer activity, the ability to overcome multi-drug resistance, or improved ionophoretic properties. These results are a good starting point for further research on the use of click chemistry in the synthesis of highly functional hybrids of natural compounds.

**Keywords:** salinomycin, ionophores, bioconjugation, click chemistry, anticancer activity

**Słowa kluczowe:** salinomycyna, jonofory, biokoniugacja, chemia „klik”, aktywność przeciwnowotworowa

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACN	– acetonitryl
AZT	– azydotymidyna
BALB/3T3	– linia prawidłowych zarodkowych mysich fibroblastów
BET	– kwas betulinowy
CSCs	– macierzyste komórki nowotworowe
CuAAC	– cykloaddycja alkinowo-azydkowa katalizowana jonami miedzi(I)
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCC	– <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCM	– dichlorometan
DIPEA	– <i>N,N</i> -diizopropylodetyloamina
DMAP	– 4-dimetyloaminopirydyna
DMF	– dimetyloformamid
EDTA	– kwas (etylenodiamino)tetraoctowy
HepG2	– linia komórkowa nowotworu wątroby
HL-60	– linia komórkowa białaczki promielocytowej
HL-60/vinc	– linia komórkowa białaczki promielocytowej odpornej na winkrystynę
HOBt	– <i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HT-29	– linia komórkowa nowotworu jelita grubego
JIMT-1	– linia komórkowa nowotworu piersi
LAS	– kwas lasalowy
LoVo	– linia komórkowa gruczolaka okrężnicy
LoVo/DX	– linia komórkowa gruczolaka okrężnicy odpornej na doksorubicynę
LS-180	– linia komórkowa nowotworu jelita grubego
MCF-10A	– linia prawidłowych komórek gruczołu sutkowego
MCF-7	– linia komórkowa nowotworu piersi
MDA-MB-231	– linia komórkowa potrójnie negatywnego nowotworu piersi
MDR	– oporność wielolekowa
MIC	– minimalne stężenie hamujące
MON	– monenzyna
MV-4-11	– linia komórkowa bifenotypowej białaczki szpikowej
PPy	– 4-pirolidynopirydyna
<i>p</i> -TsOH	– kwas <i>para</i> -toluenosulfonowy
RI	– współczynnik oporności
SAL	– salinomycyna
SI	– współczynnik selektywności
SKBR-3	– linia komórkowa nowotworu piersi
SW707	– linia komórkowa nowotworu jelita grubego
TBAF	– fluorek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TMSEtOH	– 2-(trimetylosililo)etanol
TCFH	– heksafluorofosforan <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylochloformamidyny
THF	– tetrahydrofuran
TPP <sup>+</sup>	– kation trifenylfosfoniowy
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia

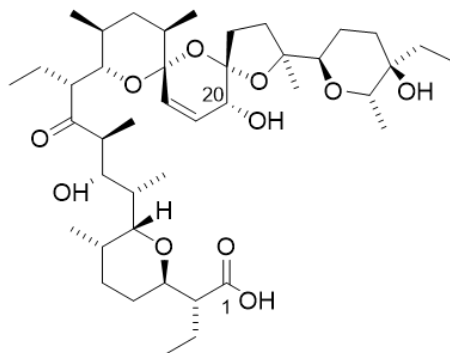
## WPROWADZENIE

Występowanie chorób nowotworowych jest poważnym problemem cywilizacyjnym, który obejmuje wszystkie grupy społeczne oraz wiekowe. Nowotwory stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów we współczesnym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), w 2018 roku odnotowano blisko 10 milionów zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi oraz ponad 18 milionów nowych przypadków zachorowań [1]. Prognozy opublikowane przez WHO jasno pokazują, że wartości te będą dynamicznie wzrastać w kolejnych latach, najprawdopodobniej osiągając poziom około 30 milionów nowych zachorowań w 2040 roku; liczba chorych niemalże się podwoi [1]. Nowotwory są również poważnym „obciążeniem” ekonomicznym; w 2010 roku na całym świecie przeznaczono ponad bilion dolarów na działania związane zarówno z leczeniem, jak i z prewencją nowotworów [2]. Przytoczone dane jednoznacznie potwierdzają, że walka z tą grupą ponad 100 różnorodnych i niezwykle trudnych do zwalczania chorób jest jednym z najważniejszych, najtrudniejszych, a także najbardziej kosztownych zadań współczesnej nauki oraz medycyny.

Wśród aktualnie stosowanych leków onkologicznych znaleźć można wiele związków pochodzenia naturalnego, na przykład doksorubicynę, kombretastatynę A-4, winkrystynę czy zasługujące na szczególną uwagę kamptotecynę i taksol, które znalazły zastosowanie między innymi w chemioterapii nowotworu jajników oraz okrężnicy [3–5]. Dużym problemem związanym ze stosowaniem chemioterapeutyków jest możliwość wykształcenia tak zwanej oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance*, MDR). Zjawisko to polega na całkowitej lub częściowej utracie wrażliwości komórek nowotworowych na stosowane terapie [6]. W efekcie terapia przestaje być skuteczna. W świetle tych doniesień, niezwykle istotnym wyzwaniem jest poszukiwanie nowych, skutecznych leków przeciwnowotworowych, które wykazują zdolność do przełamania MDR. Ciekawym kierunkiem badań obserwowanym w wielu grupach badawczych na całym świecie jest chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego, które wykazują aktywność przeciwnowotworową i wykorzystanie tego typu pochodnych jako potencjalnych chemioterapeutyków, również wobec lekoopornych linii komórek nowotworowych. Grupą produktów naturalnych o niezwykle interesujących właściwościach biologicznych (przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych, przeciwgrzybiczych, kokcydiostatycznych, przeciwnowotworowych) są antybiotyki jonoforowe (jonofory), których głównym przedstawicielem jest salinomycyna [7–10].

## 1. SALINOMYCYNĄ JAKO PRZEDSTAWICIEL ANTYBIOTYKÓW JONOFOROWYCH

Salinomycyna (SAL, Rys. 1) została wyizolowana w 1974 roku z promieniowców z rodzaju *Streptomyces albus* w trakcie badań przesiewowych mających na celu znalezienie nowych antybiotyków [11]. W 1981 roku po raz pierwszy przeprowadzono syntezę totalną tego związku, którą rozwinięto w kolejnych latach, a w 2012 roku zaprezentowano jego biosyntezę [12–14].



Rysunek 1. Struktura salinomycyny (SAL)  
Figure 1. The chemical structure of salinomycin (SAL)

Cząsteczka SAL zawiera w swojej strukturze 11 atomów tlenu, które wchodzi w skład różnorodnych grup funkcyjnych (grupa ketonowa, trzy grupy hydroksylowe, grupa karboksylowa oraz pięć eterowych atomów tlenu). Charakterystyczną cechą SAL jest obecność trójcyklicznego [6-6-5]-bis-spiroketalowego systemu pierścieni o izomerii *cis*, który rzadko występuje wśród związków pochodzenia naturalnego [15].

Karboksylowe antybiotyki jonoforowe występują w formie pseudocyklicznej, dzięki tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych typu „głowa do ogona”. W tak utworzonej strukturze atomy tlenu skierowane są do wnętrza cząsteczki, dzięki czemu może ona wiązać kationy metali. Szkielet polieterowy ma zdolność do tworzenia kompleksów zarówno z kationami jedno-, jak i dwuwartościowymi [16]. Stwierdzono, że SAL efektywniej transportuje kationy jedno- niż dwuwartościowe [11].

### 1.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA SALINOMYCYNY

SAL wykazuje znaczącą aktywność biologiczną wobec bakterii Gram-dodatnich, w związku z czym jest szeroko stosowana jako przeciwbakteryjny promotor wzrostu w hodowli zwierząt [17]. Natomiast jonofor ten okazał się nieskuteczny w walce z bakteriami Gram-ujemnymi, co wynika z obecności w ich komórkach dodatkowej, zewnętrznej błony komórkowej, która jest nieprzepuszczalna dla tego typu hydrofobowych związków [17–18]. Odkryto jednak, że niektóre kwasy organiczne mogą zwiększać przepuszczalność zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych [19]. Dzięki temu możliwe było zbadanie właściwości bakteriobójczych SAL

wobec *Escherichia coli* przy zastosowaniu tego jonoforu razem z kwasem cytrynowym [20].

W 2017 roku zbadano aktywność 2582 związków chemicznych wobec *Mycobacterium aurum* – SAL okazała się jedną z 19 najbardziej aktywnych substancji, wykazując minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC) na poziomie  $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$  [21]. Oprócz tego, SAL wykazuje umiarkowaną aktywność wobec różnych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* – bakterii wywołującej gruźlicę [21]. Warto wspomnieć, że aktywność SAL wobec szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* jest zbliżona do aktywności wykazywanej przez cyprofloksacynę – powszechnie stosowany antybiotyk [22]. SAL wykazuje aktywność *in vitro* nie tylko wobec szczepów bakterii podatnych na działanie antybiotyków, lecz również tych antybiotykoopornych [23]. Jonofor ten jest aktywny wobec wyizolowanego z pacjentów szczepu gronkowca złocistego opornego na działanie chloramfenikolu, erytromycyny, streptomycyny i tetracykliny z wartością MIC równą  $3,12 \mu\text{g mL}^{-1}$  [24].

Przeciwwgrzybicza aktywność SAL nie jest tak silna jak jej aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich [25]. Są jednak pewne wyjątki; SAL wykazuje umiarkowaną aktywność wobec *Candida albicans*, *Paecilomyces variotti*, *Penicillium digitatum* oraz *Saccharomyces cerevisiae* [26]. Warto wspomnieć, że zastosowanie SAL w połączeniu z polimiksyną B (antybiotykiem wytwarzanym przez *Bacillus polymyxa*) zwiększa jej aktywność przeciwwgrzybiczą wobec drożdży i grzybów strzępkowych (zwanych potocznie pleśnią) [27].

Przeciwwirusowa aktywność SAL została potwierdzona jedynie kilkoma doniesieniami literaturowymi. Znane są badania dotyczące działania SAL na wirusa HIV1. Spośród 10 przebadanych jonoforów, SAL okazała się najbardziej efektywną substancją do walki z wirusem, wykazując wartości  $EC_{50}$  (ang. *half maximal effective concentration*) w przedziale  $0,40 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$  [28]. Drugim przykładem potwierdzającym przeciwwirusową aktywność SAL są badania, które miały na celu znalezienie najbardziej aktywnych substancji do walki z wirusem grypy spośród 2000 badanych związków chemicznych. SAL wykazała wysoką aktywność ( $EC_{50} = 0,4\text{--}4,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Warto wspomnieć, że terapia łączona z użyciem SAL i fosforanu oseltamiruru, który jest selektywnym inhibitorem neuraminidazy (enzymu wirusa grypy), skutkowałą zwiększeniem aktywności przeciwwirusowej jonoforu [29]. Badania nad aktywnością przeciwwirusową antybiotyków jonoforowych wykazały też, że niektóre z nich, w tym SAL, mogą być rozpatrywane jako skuteczne środki w walce z wirusem SARS-CoV-2 [30–31].

Zastosowanie SAL jako dodatku do paszy dla zwierząt jest związane z wysoką aktywnością przeciw pasożytniczą tego jonoforu, szczególnie wobec pierwotniaków wywołujących kokcydiozę – chorobę pasożytniczą będącą dużym problemem w hodowli drobiu [32–33]. Sól sodowa SAL (Sacox<sup>®</sup>) jest skuteczna wobec wielu różnych pierwotniaków z rzędu *Coccidia*, rodzaju *Eimeria*, będących głównym czynnikiem chorobotwórczym wywołującym kokcydiozę [32]. Warto zaznaczyć, że

stosowanie **SAL** w walce z tą chorobą jest bardziej efektywne niż stosowanie wielu innych leków przeciw pasożytniczych [32]. **SAL** jest też skuteczna wobec świdrowców z gatunku *Trypanosoma brucei* wywołujących śpiączkę afrykańską – ludzką odmianę trypanosomozy. Jonofor ten hamuje wzrost pasożytów osiągając mikromolowe wartości  $GI_{50}$  (ang. *half maximal growth inhibition*) [34]. Przykładem choroby pasożytniczej, która ciągle stanowi zagrożenie dla mieszkańców Afryki Subsaharyjskiej jest malaria, wywoływana przez jednokomórkowego pierwotniaka z rodzaju *Plasmodium*. Badania *in vitro* wykazały, że jonofory karboksylowe, szczególnie te, które kompleksują kationy jednowartościowe, są interesującymi kandydatami na środki przeciwmalaryczne [35]. **SAL** okazała się skuteczna wobec *Plasmodium falciparum* – jednego z głównych gatunków wywołujących malarię u ludzi – osiągając nanomolowe wartości  $IC_{50}$  (ang. *half maximal inhibitory concentration*) [36]. W dodatku, **SAL** jest bardziej aktywna wobec pierwotniaków opornych na działanie chlorochiny niż powszechnie stosowane leki, takie jak amodiachina, artemeter czy artesunat. Należy zaznaczyć, że **SAL** jest bardziej aktywna i selektywna wobec pasożytów opornych na leczenie chlorochiną niż tych, które są podatne na działanie tego leku [37].

## 1.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA SALINOMYCYN

Przy omawianiu aktywności biologicznej **SAL** nie sposób nie wspomnieć o jej niezwykle wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Badania różnych grup badawczych potwierdziły jej skuteczność zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. W dodatku, jonofor ten jest w stanie przełamać MDR wielu linii komórek nowotworowych oraz jest skuteczny wobec macierzystych komórek nowotworowych (ang. *cancer stem cells*, CSCs), które są odpowiedzialne za rozwój, przerzuty oraz nawroty choroby [38–40].

W 2009 roku przeprowadzono badania przesiewowe, w których przetestowano prawie 16 tysięcy związków biologicznie aktywnych wobec macierzystych komórek nowotworu piersi. Wykazano, że jedynie 32 związki są w stanie hamować ich rozwój, przy czym to właśnie **SAL** wykazała najwyższą aktywność (przewyższając prawie stukrotnie aktywność paklitakselu, który jest powszechnie stosowanym chemioterapeutykiem w leczeniu nowotworów piersi) [38, 41]. Wiele niezależnych badań wykazało, że **SAL** jest skuteczna w testach *in vitro*, między innymi wobec nowotworu płuc, nosogardzieli, piersi, wątroby, trzustki, jajnika czy skóry [38, 42]. Badania wykazały również wysoką selektywność działania tego jonoforu w stosunku do komórek białaczkowych powodując ich apoptozę, nie niszcząc przy tym prawidłowych komórek organizmu [38, 43].

W literaturze można znaleźć doniesienia opisujące zastosowanie **SAL** w leczeniu chorób nowotworowych u dwóch pacjentek. Jedna z nich cierpiała na inwazyjny nowotwór piersi z przerzutami do kości, a u drugiej zdiagnozowano płaskonabłonkowy nowotwór sromu z przerzutami do kości miednicowej. Obu pacjentkom podawano dożylnie **SAL** w dawce 200–250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  co drugi dzień. Oprócz kilku efektów ubo-

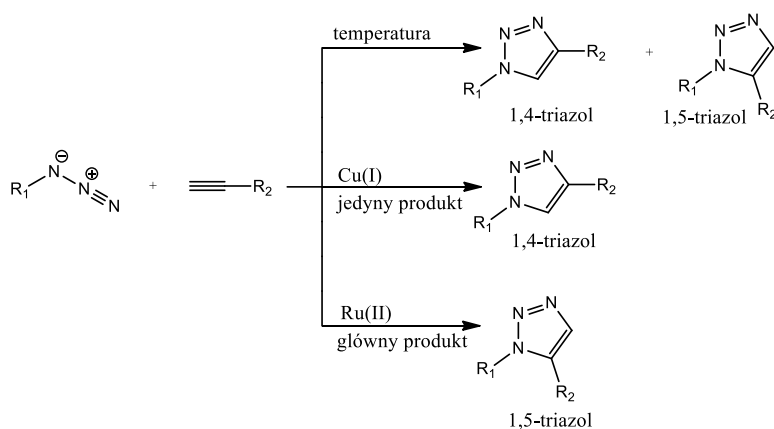


cznych (łagodna tachykardia, drżenie rąk) nie zaobserwowano długotrwałych działań niepożądanych, takich jak np. łysienie czy wymioty [38, 44].

W 2012 roku wykazano, że **SAL** może być stosowana w terapii nowotworów jako środek uwrażliwiający. Efekt uczulający **SAL** polega na zwiększeniu skuteczności innych metod leczenia choroby (np. radioterapii lub chemioterapii), gdy są one stosowane razem z tym jonoforem. Efekt synergiczny stosowania **SAL** zaobserwowano między innymi dla gemcytabiny (wobec CSCs trzustki), imatynibu (wobec CSCs przewodu pokarmowego) oraz dla metod radioterapii przez wzrost stopnia uszkodzenia DNA i spadek poziomu białek p21 [38, 45–46]. Podobny efekt obserwuje się przy zastosowaniu **SAL** razem z innymi chemioterapeutykami, np. doksorubicyną, winblastyną czy cisplatyną [42].

## 2. CHEMIA „KLIK”

W 2001 roku Sharpless przedstawił nowe podejście w projektowaniu i syntezie związków lekopodobnych, co w następnych latach przyczyniło się do gwałtownego rozwoju chemii medycznej i przyspieszyło proces poszukiwania nowych kandydatów na leki [48]. W swojej pracy omówił metody syntezy, które cechuje wysoka selektywność i wydajność, odporność na warunki wodne i tlenowe, stosowanie nietoksycznych rozpuszczalników oraz niewielka ilość produktów ubocznych, które można usunąć metodami niechromatograficznymi. Grupę reakcji spełniających wymienione kryteria nazwał chemią „klik”, co może kojarzyć się z dźwiękiem zamykanego zamka i koncepcyjnie oddaje prostotę i efektywność tego procesu oraz kompatybilność reagentów, które biorą w nim udział. Przykładami reakcji „klik” są między innymi cykloaddycja (hetero-)Dielsa-Aldera, substytucja nukleofilowa w naprężonych układach heterocyklicznych czy reakcja syntezy imin ze związków karbonylowych. Najważniejszym przykładem chemii „klik” pozostaje jednak 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena, czyli cykloaddycja azydowo-alkinowa (Rys. 2) [49].



Rysunek 2. Otrzymywanie układów 1,2,3-triazolowych w reakcji cykloaddycji azydowo-alkinowej  
Figure 2. Preparation of 1,2,3-triazole systems by azide-alkyne cycloaddition reaction

1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena to reakcja pomiędzy azydkiem a terminalnym (lub aktywowanym) alkinem, której produktem jest układ 1,2,3-triazolowy. Jeśli reakcja jest prowadzona jedynie termicznie, bez dodatku katalizatora, to jej czas trwania jest długi i otrzymuje się mieszaninę regioizomerów – 1,4- oraz 1,5-dwupodstawionych 1,2,3-triazoli. Zastosowanie kationów miedzi(I) skraca czas trwania reakcji oraz umożliwia regioselektywne otrzymanie jedynie 1,4-dwupodstawionego układu triazolowego (Rys. 2) [50]. Proces można też prowadzić przy zastosowaniu związków koordynacyjnych rutenu(II) – wtedy produktem takiej reakcji jest 1,5-dwupodstawiony układ triazolowy (Rys. 2) [51].

Najczęściej stosowanym wariantem 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena jest ten, w którym stosuje się kationy miedzi(I) i otrzymuje się 1,4-dwupodstawione pierścienie triazolowe (ang. *copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, CuAAC). Taką reakcję można przeprowadzić na dwa sposoby:

- w wariacie Sharplessa – zastosowanie siarczynu(VI) miedzi(II) oraz czynnika redukującego (najczęściej askorbinianu sodu), który pozwala na otrzymanie kationów Cu(I) *in situ*. W tych warunkach stosuje się układy wodno-alkoholowe, które umożliwiają rozpuszczenie wszystkich użytych reagentów [50];
- w wariacie Meldala – zastosowanie jodku miedzi(I). Reakcję prowadzi się np. w acetonitrylu, jednak wymagane jest użycie gazu obojętnego, aby zapobiec utlenieniu kationów Cu(I) do Cu(II) [52].

Za swoje badania nad chemią „klik” Barry Sharpless oraz Morten Meldal zostali uhonorowani w 2022 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Wraz z nimi nagrodę otrzymała Carolyn Bertozzi za badania nad chemią bioortogonalną. Ten rodzaj chemii polega na zastosowaniu reakcji "klik" w komórkach, bez zaburzenia procesów biochemicznych w nich zachodzących. Podejście to znajduje zastosowanie w diagnostyce oraz procesie znakowania, co pomaga lepiej zrozumieć chemiczne oraz biologiczne funkcjonowanie komórki [53].

### 3. ZASTOSOWANIE CHEMII „KLIK” DO SYNTEZY BIONIUGATÓW SALINOMYCYN

Proces bioniugacji polega na łączeniu dwóch lub więcej bioaktywnych cząsteczek za pomocą wiązania kowalencyjnego. Jest to jedna z najczęściej stosowanych strategii w opracowywaniu nowych hybryd o lepszej skuteczności działania w porównaniu do związków wyjściowych. Bioniugaty mogą zostać utworzone przez połączenie w jednej cząsteczce dwóch lub więcej biomolekuł albo przez łączenie biomolekuł z syntetycznymi małymi cząsteczkami. Tego typu hybrydy mogą wykazać szereg potencjalnych zastosowań, między innymi jako nowe środki terapeutyczne [54–56].

Warto podkreślić, że chemiczna modyfikacja antybiotyków jonoforowych, w tym SAL, jest procesem trudnym. Ze względu na swoją charakterystyczną budowę, w tym obecność wspomnianego, trójcyklicznego [6-6-5]-bis-spiroketalowego systemu pier-

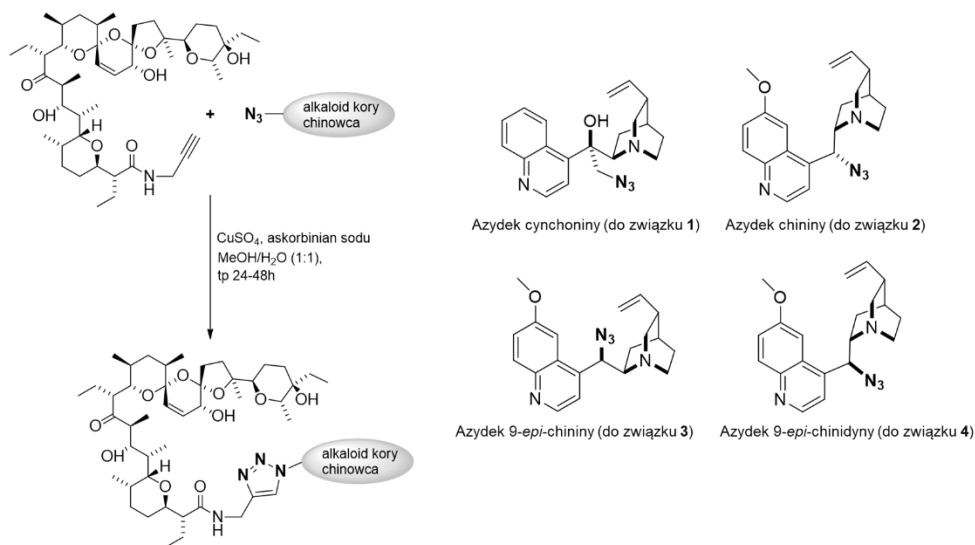
ścieni, SAL jest związkiem wrażliwym na czynniki zewnętrzne i ulega nieodwracalnemu rozpadowi w środowisku kwasowym, mocno zasadowym oraz przy zbyt intensywnym ogrzewaniu [13]. Dobrane metody biokoniugacji tego związku muszą być zatem możliwe do przeprowadzenia w łagodnych warunkach. Reakcja CuAAC spełnia te kryterium, więc z powodzeniem została zastosowana do chemicznej modyfikacji struktury SAL, w tym syntezie jej koniugatów z innymi biologicznie aktywnymi cząsteczkami. Do tej pory opisano triazolowe hybrydy SAL z alkaloidami kory chinowca, nukleozydami, kationem trifenylofosfoniowym, innymi antybiotykami jonoforowymi czy też kwasem betulinowym.

### 3.1. KONIUGATY Z ALKALOIDAMI KORY CHINOWCA

Alkaloidy kory drzewa chinowego izolowane z *Cinchona L.* to grupa naturalnie występujących związków, które przez wiele lat stosowane były jako leki przeciwmalaryczne i przeciwartymiczne [54, 57]. W ostatnich latach udowodniono, że substancje te wykazują również bardzo interesujące właściwości przeciwnowotworowe. Chinina i cynchonina skutecznie przełamują lekooporność komórek nowotworowych pacjentów leczonych przy użyciu chemioterapeutyków, takich jak np. paklitaksel czy doksorubicyna [54, 58].

#### Synteza koniugatów

W 2015 roku zastosowano chemię „klik” do syntezy serii biokoniugatów SAL z czterema różnymi alkaloidami kory drzewa chinowego (Rys. 3) – azydkami cynchoniny (związek 1), chininy (związek 2), 9-*epi*-chininy (związek 3) i 9-*epi*-chinidyny (związek 4). Reakcję pomiędzy amidem propargilowym SAL i odpowiednim azydkiem alkaloidu kory chinowej katalizowano jonami miedzi(I) zgodnie z raportem Sharplessa (Rys. 3). Proces przeprowadzono w układzie rozpuszczalników woda/metanol (1/1, v/v). Dobór odpowiednich objętości rozpuszczalnika organicznego oraz wody był o tyle istotny, że wszystkie zastosowane reagenty musiały ulec rozpuszczeniu. Było to zadanie o tyle utrudnione, że w reakcji brały udział duże cząsteczki organiczne oraz związki nieorganiczne. Po spełnieniu wyżej wymienionych warunków, reakcja „klik” zaszła bez problemu w temperaturze pokojowej w czasie 24–48 godzin. Obserwacja zaniku jednego z reagentów (w tym wypadku azydku alkaloidu kory chinowca) za pomocą chromatografii cienkowarstwowej pozwoliła na określenie momentu zakończenia reakcji. Następca ekstrakcja typu ciec-z-ciecz (chloroform/wodny roztwór EDTA) pozwoliła na przeniesienie produktu (oraz resztek nieprzereagowanych substratów organicznych) całkowicie do warstwy organicznej. Biokoniugaty zostały finalnie oczyszczone za pomocą chromatografii kolumnowej i wyizolowane z zadowalającą wydajnością 50–78% [54, 59].



Rysunek 3. Synteza biokoniugatów SAL z alkaloidami kory chinowca [59]

Figure 3. Synthesis of SAL bioconjugates with *Cinchona* bark alkaloids [59]

### Aktywność przeciwnowotworowa koniugatów

Otrzymane hybrydy poddane zostały testom w celu określenia ich aktywności przeciwnowotworowej. W badaniach użyto różnorodnych linii komórek nowotworowych, w tym gruczolaka okrężnicy (LoVo), jego wariantu opornego na działanie dokсорubicyny (LoVo/DX) oraz nowotworu wątroby (HepG2). W celu określenia selektywności działania otrzymanych analogów, przeprowadzono również badania na normalnych mysich embrjonalnych fibroblastach (BALB/3T3) jako linii referencyjnej. Związki **3** i **4** (Rys. 3) wykazały aktywność przeciwnowotworową w zakresie stężeń mikromolowych ( $\text{IC}_{50} < 3,00 \mu\text{M}$ ), przy czym ich toksyczność wobec linii referencyjnej była niższa niż toksyczność dokсорubicyny i cisplatyny. Warto wspomnieć, że analiza współczynników lekooporności wykazała, że związki **2** i **3** skutecznie przebijają lekooporność linii LoVo/DX. Badania potwierdziły, że koniugacja SAL z alkaloidami kory drzewa chinowego za pomocą linkera triazolowego może prowadzić do hybryd o interesujących właściwościach biologicznych, w tym niższej toksyczności niż powszechnie stosowane cytostatyki [54, 59].

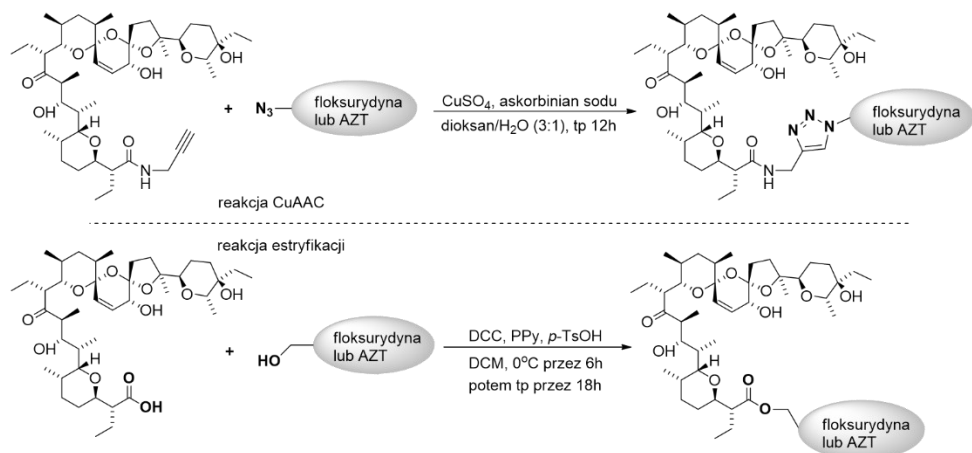
### 3.2. KONIUGATY Z NUKLEOZYDAMI

W grupie nukleozydów dwa związki zasługują na szczególną uwagę ze względu na swoje właściwości farmakologiczne – floksurydyna (5-fluoro-2'-deoksyurydyna), będąca najbardziej znaną pochodną 5-fluorouracylu, oraz AZT (azydotymidyna). Mechanizm działania floksurydyny jest dobrze znany, a jej wysoka aktywność przeciwnowotworowa sprawia, że jest związkiem stosowanym w leczeniu różnych typów nowotworów. Działanie chemioterapeutyczne jest jednak znacznie ograniczone

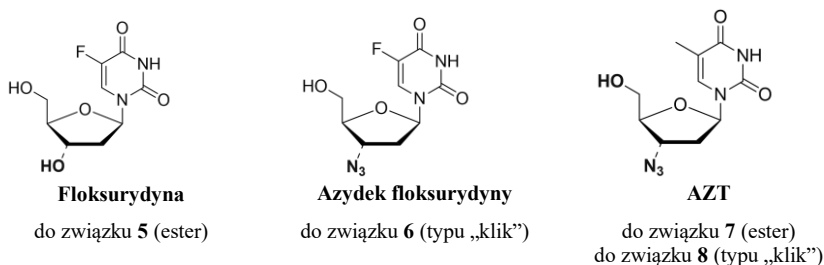
ze względu na niską biodostępność oraz wysoką toksyczność [54, 60]. AZT z kolei jest lekiem przeciwretrowirusowym, jednak jego repozycjonowanie do terapii nowotworów jest znacznie ograniczone przez wysoką toksyczność, prowadzącą między innymi do supresji szpiku kostnego i miopatii [61]. Biokoniugacja związków biologicznie aktywnych z innymi selektywnymi cząsteczkami, jak np. z **SAL**, może znacząco wpłynąć na poprawę ich profilu farmakologicznego.

### Synteza koniugatów

Pierwsza z metod syntezy polegała na 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena przeprowadzonej zgodnie z raportem Sharplessa (obecność siarczynu miedzi(II) oraz askorbinianu sodu). Substratami dla tej reakcji były amid propargilowy **SAL** oraz azydowa pochodna odpowiedniego nukleozydu (Rys. 4). Proces przeprowadzono w układzie rozpuszczalników woda/dioksan (1/3, v/v). Zwiększenie objętości użytego rozpuszczalnika organicznego było konieczne ze względu na znacząco ograniczoną rozpuszczalność nukleozydów oraz amidu **SAL** w wodzie. Reakcję prowadzono przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Oba koniugaty typu „klik” (związki **6** i **8**, Rys. 4) oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej i wyizolowano z wydajnością 67% dla koniugatu z floksurydyną oraz 61% dla koniugatu z AZT. Alternatywna metoda syntezy koniugatów polegała z kolei na reakcji grupy karboksylowej **SAL** z grupą hydroksylową odpowiedniego nukleozydu w warunkach estryfikacji Steglicha (DCC, PPy oraz kwas *para*-toluenosulfonowy) (związki **5** i **7**, Rys. 4). Koniugaty estrowe wyizolowano z wydajnością 55% w przypadku estru z floksurydyną oraz 73% w przypadku estru z AZT [54, 62–63]. Porównując obie metody syntezy można zauważyć, że wydajność przeprowadzonych reakcji jest porównywalna. Niemniej, w przypadku koniugacji cząsteczki **SAL** z floksurydyną, reakcja „klik” była wydajniejsza od reakcji estryfikacji, co jednoznacznie potwierdza jej wysoki potencjał w otrzymywaniu złożonych hybryd związków biologicznie aktywnych.



Zastosowane bloki budulcowe (floxurydyna, jej azydek i AZT):



Rysunek 4. Synteza biokoniugatów SAL z nukleozydami [62–63]

Figure 4. Synthesis of SAL bioconjugates with nucleosides [62–63]

### Aktywność przeciwnowotworowa koniugatów

W badaniach aktywności przeciwo proliferacyjnej otrzymanych hybryd wykorzystano siedem linii komórek nowotworowych, w tym ludzkiej białaczki promielocytowej (HL-60) oraz jej wariantu opornego na działanie winkrystyny (HL-60/vinc), gruczolaka okrężnicy (LoVo) oraz jego wariantu opornego na działanie doksorubicyny (LoVo/DX), a także trzech innych linii komórkowych raka okrężnicy, tj. HT-29, LS-180 i SW707. Aktywność obu koniugatów SAL z AZT została dodatkowo określona wobec komórek ludzkiej białaczki mielomonocytovej (MV-4-11). Badania wykazały, że hybrydy estrowe (związki 5 i 7, Rys. 4) wykazały znacznie wyższą aktywność przeciwnowotworową niż hybrydy typu "klik" (związki 6 i 8, Rys. 4). Warto przy tym podkreślić, że aktywność biologiczna związku 5 okazała się dużo lepsza niż niemodyfikowanego nukleozydu oraz dwóch leków referencyjnych. Związek ten wykazał ponadto aktywność przeciwnowotworową porównywalną do SAL, jednak współczynnik selektywności oraz lekooporności wobec linii LoVo/DX były wyższe (mniej obiecujące) niż dla wyjściowego jonoforu [54, 62–63]. Obserwowane różnice

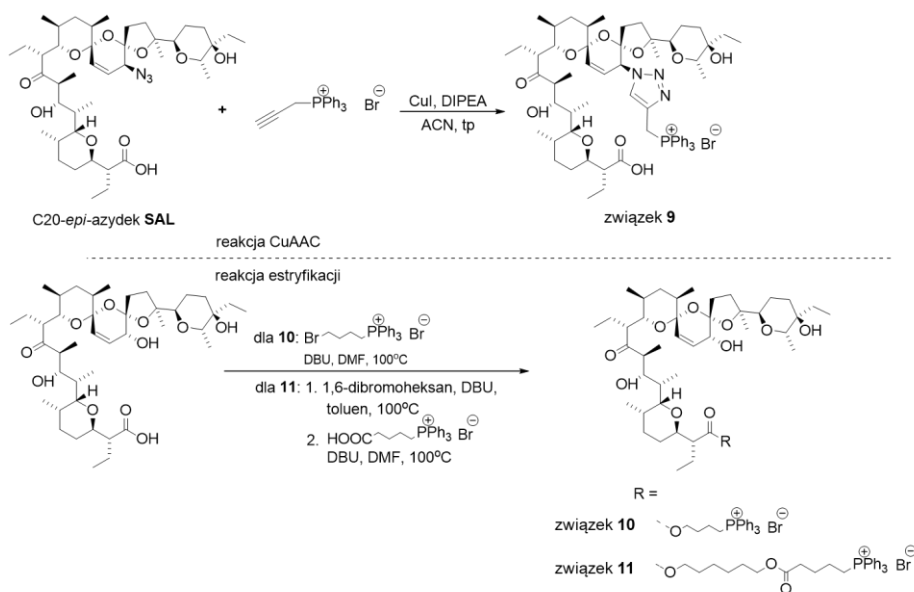
w aktywności przeciwnowotworowej mogą wynikać z niższej stabilności enzymatycznej wiązania estrowego w porównaniu z wiązaniem amidowym/układem triazolowym, co może skutkować uwolnieniem biologicznie aktywnej formy SAL wewnątrz komórek nowotworowych [54, 64–65].

### 3.3. KONIUGATY Z KATIONEM TRIFENYLOFOSFONIOWYM

Bardzo ważnym parametrem do wstępnej oceny kandydatów na leki przeciwnowotworowe jest selektywność ich działania, czyli zdolność do zwalczania komórek nowotworowych przy jednoczesnej neutralności wobec komórek zdrowych. Projektowanie analogów o wysokiej selektywności jest aktualnie jednym z najbardziej wymagających wyzwań w terapii przeciwnowotworowej. W tym kontekście warto wspomnieć, że wiele chorób (nowotwory, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne) jest związanych z funkcjonowaniem mitochondriów [66–68]. Badania wskazują, że mitochondria odgrywają ważną rolę zarówno w zewnętrznych, jak i wewnętrznych ścieżkach apoptozy, co czyni je ważnymi celami terapeutycznymi przy projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych. Permabilizacja błony mitochondrialnej jest zjawiskiem warunkującym skierowanie komórki nowotworowej na szlak apoptozy, a w konsekwencji prowadzi do jej śmierci [66–68]. Znanych jest wiele substancji i ugrupowań chemicznych, które w komórce kierowane są do mitochondriów. Jednym z przykładów jest kation trifenylofosfoniowy (TPP<sup>+</sup>) [67–68].

#### Synteza koniugatów

W celu zwiększenia selektywności działania SAL oraz jej pochodnych, rozsądnym krokiem wydaje się biokoniugacja z TPP<sup>+</sup>. W tym kontekście, w ostatnim czasie otrzymano serię analogów SAL modyfikowanych zarówno w pozycji C1, jak i C20, przy czym jedna z hybryd została otrzymana za pomocą reakcji CuAAC pomiędzy C20-*epi*-azydkiem SAL oraz propargilową pochodną TPP<sup>+</sup> (związek **9**, Rys. 5). Proces przeprowadzono według protokołu Meldala z zastosowaniem jodku miedzi(I) jako źródła jonów Cu(I). Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność jodku miedzi(I), reakcję prowadzono w acetonitrylu. Do kontroli przebiegu reakcji wykorzystano chromatografię cienkowarstwową. Zanik substratu nastąpił po około 24 godzinach prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej. Reakcja może być również prowadzona w warunkach Sharplessa, jednak zastosowanie warunków Meldala umożliwiło otrzymanie produktu z wyższą 38% wydajnością [69]. Umiarkowane przereagowanie substratów zaobserwowane w tym przypadku może być wytłumaczone względami sterycznymi, a konkretniej, próbą wprowadzenia objętościowo dużego podstawnika trifenylofosfoniowego do centralnej części SAL. W przypadku pochodnych estrowych (związki **10** i **11**, Rys. 5), wydajność syntezy związku **10** wynosiła 31%, podczas gdy wydajność dwuetapowej syntezy związku **11** wyniosła 64%, co może być potwierdzeniem hipotezy związanej z zawadą steryczną – przyłączenie grupy trifenylofosfoniowej zachodziło łatwiej na dłuższym łańcuchu (linkerze) węglowym [69].



Rysunek 5. Synteza biokoniugatów SAL z kationem tryfenylofosfoniowym [69]

Figure 5. Synthesis of SAL bioconjugates with triphenylphosphonium cation [69]

### Aktywność jonoforetyczna koniugatów

Pochodna triazolowa (związek 9) wykazała wysoką aktywność jonoforetyczną zarówno w badaniach na błonach sztucznych (płaskie dwuwarstwy lipidowe i liposomy), jak i naturalnych (mitochondria), natomiast hybrydy SAL z TPP<sup>+</sup> przyłączonym w pozycji C1 (związki 10 i 11) okazały się nieaktywne [69]. Przepuszczalność związków przez błony lipidowe zbadano za pomocą obserwacji kinetyki relaksacji prądu po wywołaniu na błonie skoku napięcia. Relaksacja jest związana z redystrybucją ładunku w dwuwarstwie lipidowej. Związek 9 powodował znacznie szybszą relaksację prądu w przeprowadzonych badaniach niż związki 10 i 11, co sugeruje jego wysoką przepuszczalność przez dwuwarstwę lipidową [69]. Potwierdza to dużą skuteczność tego związku w transporcie kationów potasu i wodoru zarówno przez sztuczne (liposomalne), jak i mitochondrialne błony. SAL i związek 9 nie indukowały przepływu prądu przez płaską dwuwarstwę lipidową, co potwierdza, że mechanizm działania jest oparty jedynie na wymianie kationów K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Wymiana jonowa wywołana przez związek 9 w mitochondriach była intensywniejsza od tej zaobserwowanej dla SAL, co sugeruje akumulację hybrydy 9 w mitochondriach [69].

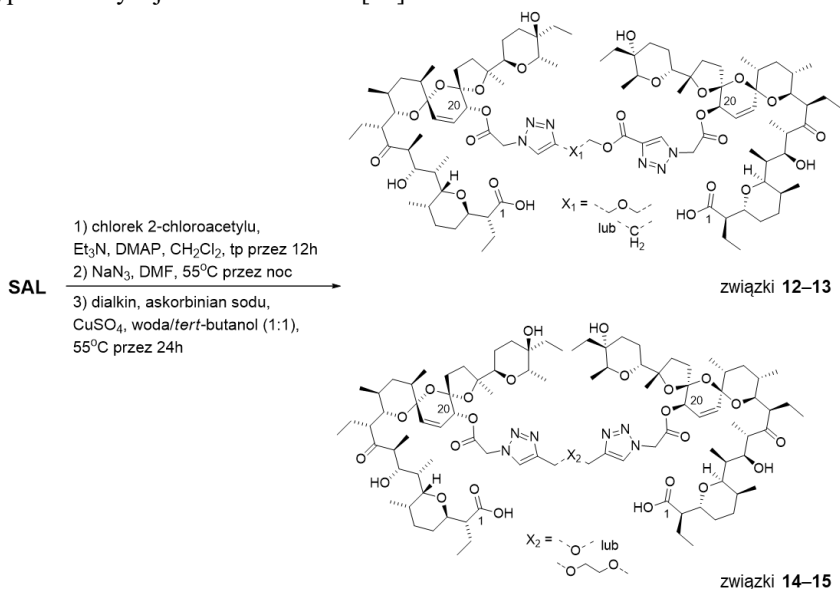


### 3.4. HOMO- I HETERODIMERY ANTYBIOTYKÓW JONOFOROWYCH

Niezwykle interesującym kierunkiem badań nad chemiczną modyfikacją **SAL** i innych antybiotyków jonoforowych jest synteza ich struktur dimerycznych. Tego typu związki mogą np. charakteryzować się zdolnością do koordynowania dwóch kationów metali i w ten sposób zwiększać efektywność ich transportu przez błony biologiczne. Pierścień triazolowy otrzymany w wyniku reakcji "klik" jest potencjalnie dobrym linkerem w tego typu hybrydach ze względu na swoją wysoką stabilność enzymatyczną w warunkach fizjologicznych.

#### Synteza dimerów

W 2017 roku otrzymano kilkanaście triazolowych pochodnych **SAL**, w tym cztery dimery, w których cząsteczki jonoforu połączone zostały za pomocą linkera wprowadzonego w pozycję C20 (związki **12–15**, Rys. 6). Dla koniugatów w pozycji C20, reakcję „klik” przeprowadzono w układzie rozpuszczalników woda/*tert*-butanol (1/1, v/v). Dodatkowo, reakcja wymagała podwyższonej temperatury. Mogło to być spowodowane zawadą steryczną utrudniającą wprowadzenie dwóch podstawników triazolowych do wewnętrznej części cząsteczki jonoforu (Rys. 6). Oczekiwane struktury dimeryczne wyizolowano z wydajnościami 65–76%. Co ciekawe, w tej samej pracy opisano syntezę pochodnych C1 triazolowych **SAL**. Otrzymano je również według protokołu Sharplessa, jednak w dość nietypowym, dwufazowym układzie rozpuszczalników woda/DCM (1/1, v/v). Pochodne dimeryczne otrzymano w tym przypadku z wydajnościami 54–91% [70].

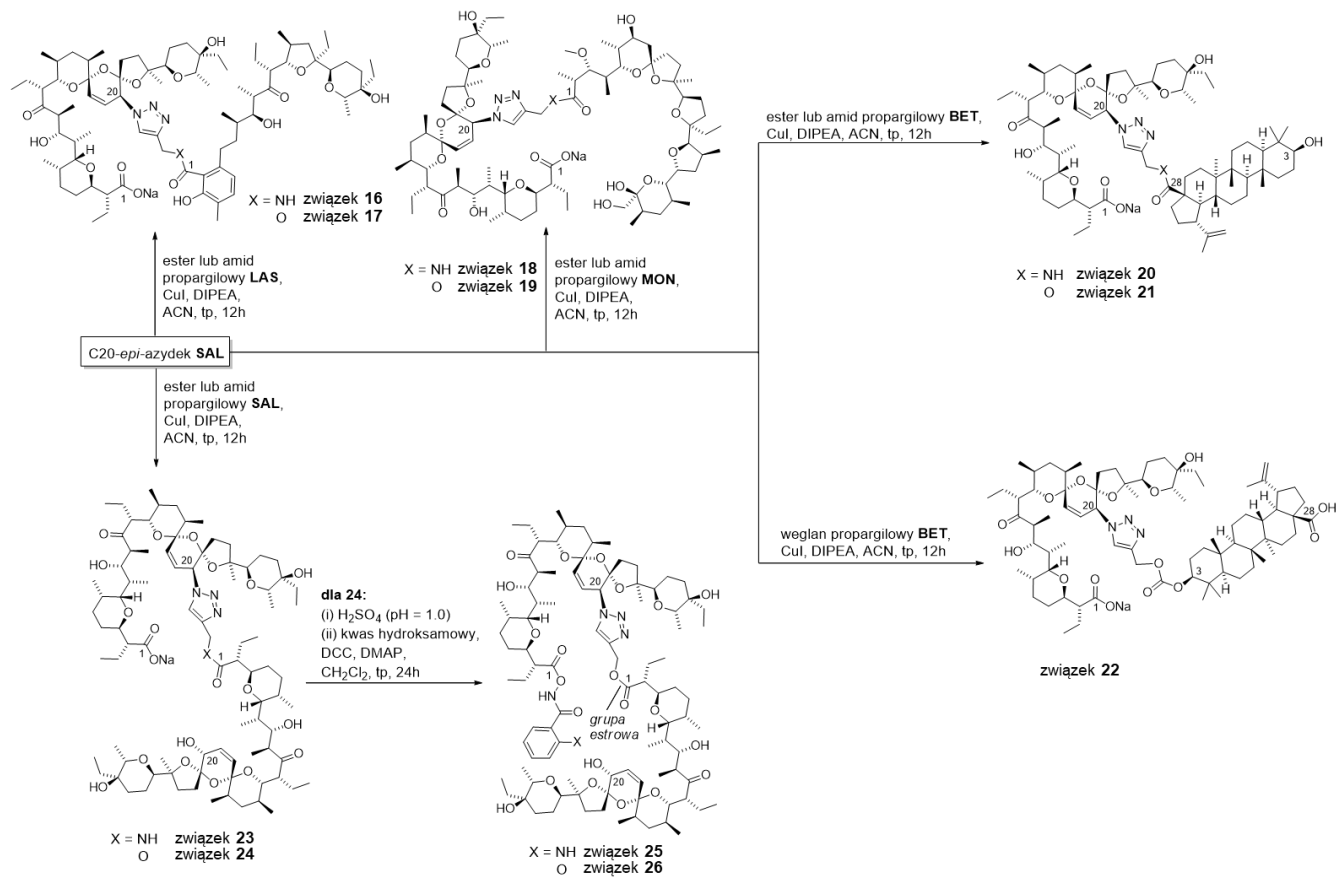


Rysunek 6. Synteza wybranych dimerów **SAL** [70]

Figure 6. Synthesis of selected **SAL** dimers [70]

W 2021 roku przeprowadzono syntezę homodimerów **SAL** połączonych ze sobą w pozycjach C1 i C20, a także heterodimerów antybiotyków jonoforowych, w których cząsteczkę **SAL** połączono za pomocą reakcji CuAAC z innymi przedstawicielami tej grupy – monenzyną (**MON**) oraz kwasem lasalowym (**LAS**) (związki **16–19** i związki **23–24**, Rys. 7). Ponadto, w celu zwiększenia różnorodności otrzymanych struktur, w badaniach uwzględniono również syntezę kilku koniugatów **SAL** ze związkiem triterpenowym – kwasem betulinowym (**BET**) (związki **20–22**, Rys. 7), który wykazuje działanie wobec komórek nowotworowych, również tych lekoopornych [72]. Kluczowymi substratami użytymi do syntezy dimerów jonoforów były C20-*epi*-azydek **SAL** oraz prekursorzy propargilowe wszystkich wymienionych wyżej związków, otrzymane przez chemiczną modyfikację ich grupy karboksylowej (estry propargilowe oraz *N*-amidy propargilowe **SAL**, **MON**, **LAS** i **BET**). Dodatkowo, przeprowadzono reakcję *O*-acylowania grupy C3-hydroksylowej **BET** za pomocą chloromrówczanu propargilu, zaś otrzymany w ten sposób węglan posłużył w kolejnym kroku jako substrat do syntezy biokoniugatu z **SAL**. Prekursory te zostały otrzymane zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze lub z ich niewielkimi modyfikacjami [72].

Mając dostęp do C20-*epi*-azydku **SAL** oraz serii prekursorów propargilowych, przeprowadzono serię reakcji "klik" zgodnie z raportem Meldala (przy użyciu jodku miedzi(I) w acetonitrylu oraz atmosferze gazu obojętnego) (Rys. 7). Reakcje przebiegły w oczekiwany sposób z wydajnościami 37–81% dając serię 9 nowych dimerów, w których obie cząsteczki połączone zostały za pomocą linkera triazolowego (związki **16–24**). Ponadto, jeden wybrany dimer (związek **24**) został skoniugowany z kwasem benzhydroksamowym lub salicylohydroksamowym, co podyktowane zostało wcześniej opublikowanymi doniesieniami o obiecującej bioaktywności tego typu układów. Dzięki temu seria została rozszerzona o dwie dodatkowe hybrydy (związki **25–26**, Rys. 7). Ich synteza przebiegła z umiarkowaną wydajnością 31–32% [73–75].



Rysunek 7. Synteza homo- i heterodimerów antybiotyków jonoforowych oraz ich koniugatów z wybranymi kwasami hydroksamowymi [72]  
 Figure 7. Synthesis of homo- and heterodimers of ionophores and their conjugates with selected hydroxamic acids [72]

## Aktywność przeciwnowotworowa dimerów

W grupie pochodnych triazolowych otrzymanych w 2017 roku to właśnie dimery **SAL** wykazały najwyższą aktywność wobec linii komórkowej nowotworu piersi MCF-7 [38, 70]. Analiza rentgenostrukturalna **SAL** i jej pochodnych wykazała, że allilowa grupa hydroksylowa w pozycji C20 nie uczestniczy w kompleksowaniu kationów metali [71]. Można więc wysnuć wniosek, że wprowadzenie linkera triazolowego w pozycję C20 cząsteczki **SAL** nie wpłynęło negatywnie na zdolność tego typu hybryd do kompleksowania kationów metali, dzięki czemu wykazywały one wysoką aktywność wobec komórek nowotworowych [38, 70].

Z kolei wszystkie hybrydy otrzymane w 2021 roku (związki **16–26**) zostały poddane testom *in vitro* w celu wyznaczenia ich aktywności przeciwproliferacyjnej na sześciu liniach komórek nowotworowych, w tym ludzkiej bifenotypowej białaczce szpikowej (MV-4-11), trzech liniach nowotworu piersi (JIMT-1, MCF-7, SKBR-3), ludzkim gruczolaku okrężnicy (LoVo) oraz jego wariacie opornym na działanie doksorubicyny (LoVo/DX). Badania selektywności przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii referencyjnych – prawidłowych komórek gruczołu sutkowego (MCF-10A) oraz prawidłowych zarodkowych mysich fibroblastów (BALB/3T3) [72]. Analiza wartości IC<sub>50</sub> pozwoliła ustalić, że większość otrzymanych dimerów wykazuje aktywność przeciwproliferacyjną w mikromolowym zakresie stężeń. W niektórych przypadkach otrzymane koniugaty okazały się bardziej aktywne niż związki wyjściowe i powszechnie stosowane cytostatyki. Na przykład, biorąc pod uwagę linię JIMT-1, wartość IC<sub>50</sub> dla związku **17** wyniosła 0,76 μM, co było korzystniejsze od wartości IC<sub>50</sub> = 5,55 μM, 2,67 μM i 8,23 μM uzyskanych odpowiednio dla **LAS**, **SAL** i cisplatyny [72].

## UWAGI KOŃCOWE

Rozwój strategii syntezy biologicznie aktywnych biokoniugatów jest niezwykle atrakcyjnym kierunkiem badań w chemii medycznej. Jej zastosowanie do chemicznej modyfikacji antybiotyków jonoforowych, w tym salinomycyny (**SAL**), pozwala na uzyskanie hybryd o specyficznych właściwościach – zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej, zdolności do przełamywania oporności wielolekowej lub lepszych właściwości jonoforetycznych. Opisane w artykule biokoniugaty otrzymano z zadowalającą wydajnością z wykorzystaniem 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I), czyli reakcji będącej najpopularniejszym przykładem nagrodzonej w 2022 roku Nagrodą Nobla chemii „klik”. Warto wspomnieć, że biokoniugacja niektórych hybryd oparta była na wytworzeniu wiązania estrowego lub amidowego, przy czym rodzaj użytego linkera mocno wpływał na aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych.

Zebrany materiał badawczy jasno pokazuje, że proces biokoniugacji związków pochodzenia naturalnego za pomocą chemii „klik” może być skuteczną metodą otrzy-

mywania nowych kandydatów na leki (Tabela 1); przykładem są omówione wyżej dimery antybiotyków jonoforowych. Można stwierdzić, iż hybrydy z linkerem estrowo-triazolowym należy klasyfikować nie tylko jako najbardziej obiecujące biokoniuagaty **SAL**, ale też jako jedne z najbardziej aktywnych pochodnych tego jonoforu opisanych do tej pory w literaturze. Wyniki te są dobrym punktem wyjścia do dalszych badań dotyczących zastosowania chemii „klik” w syntezie wysoce funkcjonalnych hybryd związków pochodzenia naturalnego. Naszym zdaniem ten kierunek badawczy będzie odgrywać coraz większą rolę w rozwoju chemii medycznej i projektowaniu nowych leków. Racjonalny dobór substratów wyjściowych i wybór odpowiedniego linkera umożliwi na przykład ochronę labilnych produktów przed degradacją enzymatyczną, zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, a tym samym biodostępności leków oraz poszerzenie okna terapeutycznego konkretnej substancji. Wyniki badań opisane w niniejszym artykule zachęcają nas do kontynuowania badań w tym zakresie; chemia „klik” nadal będzie stosowana w naszej grupie badawczej w celu projektowania nowych, wysoce bioaktywnych hybryd produktów pochodzenia naturalnego.

Tabela 1. Podsumowanie metod syntezy biokoniugatów salinomycyny wraz z wydajnościami reakcji ich otrzymywania oraz wykazem linii komórkowych, na których przeprowadzone były badania biologiczne [59, 62–63, 69, 70, 72]

Table 1. Summary of the synthetic methods of salinomycin bioconjugates with the yields of the reactions and the list of cell lines used in the biological activity tests [59, 62–63, 69, 70, 72]

Partner do koniugacji	Związek	Metoda syntezy	Wydajność reakcji	Linie komórkowe
Alkaloidy kory chinowca	1–4, Rys. 3	Reakcja Sharplessa	50–78%	LoVo, LoVo/DX, HepG2, BALB/3T3
Nukleozydy	5 i 7, Rys. 4	Reakcja estryfikacji	55–73%	HL-60, HL-60/vinc, LoVo, LoVo/DX, HT-29, LS-180, SW707, MV-4-11, BALB/3T3
	6 i 8, Rys. 4	Reakcja Sharplessa	61–67%	
Kation tryfenylofosfoniowy	9, Rys. 5	Reakcja Meldala	38%	Badań nie przeprowadzono
	10 i 11, Rys. 5	Reakcja estryfikacji	31–64%	
Antybiotyki jonoforowe	12–15, Rys. 6	Reakcja Sharplessa	65–76%	LoVo, LoVo/DX, JIMT-1, MCF-7, SKBR-3, MCF-10A
	16–19, 23 i 24, Rys. 7	Reakcja Meldala	52–70%	MV-4-11, JIMT-1, MCF-7, SKBR-3, LoVo, LoVo/DX, MCF-10A, BALB/3T3
	25 i 26, Rys. 7	Reakcja estryfikacji	31–32%	
Triterpenoidy	20–22, Rys. 7	Reakcja Meldala	37–81%	

Linie komórkowe: LoVo (ludzki gruczolak okrężnicy), LoVo/DX (ludzki gruczolak okrężnicy oporny na doksorubicynę), HepG2 (ludzki nowotwór wątroby), HL-60 (ludzka białaczka promielocytowa), HL-60/vinc (ludzka białaczka promielocytowa oporna na winkrystynę), HT-29, LS-180, SW707 (ludzki nowotwór jelita grubego o różnej charakterystyce), MV-4-11 (ludzka bifenotypowa białaczka szpikowa), JIMT-1, MCF-7, SKBR-3 (ludzki nowotwór piersi o różnej charakterystyce), MCF-10A (ludzkie prawidłowe komórki gruczołu stukowego), BALB/3T3 (prawidłowe zarodkowe mysie fibroblasty).

Cell lines: LoVo (human colon adenocarcinoma), LoVo/DX (doxorubicin-resistant human colon adenocarcinoma), HepG2 (human liver cancer), HL-60 (human promyelocytic leukemia), HL-60/vinc (vincristine-resistant human promyelocytic leukemia), HT-29, LS-180, SW707 (human colorectal adenocarcinoma with different characteristics), MV-4-11 (human biphenotypic myelomonocytic leukemia), JIMT-1, MCF-7, SKBR-3 (human breast cancer with different characteristics), MCF-10A (human normal breast epithelial cell line), BALB/3T3 (normal murine embryonic fibroblasts).

## PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowania Kapitulie Konkursu Polskiego Towarzystwa Chemicznego za przyznanie mi nagrody za pracę magisterską.

Badania nad zastosowaniem chemii „klik” w syntezie koniugatów salinomycyny finansowane były w ramach projektów Narodowego Centrum Nauki – Sonata 12 (nr 2016/23/D/ST5/00242) oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Iuventus Plus (nr IP2012013272).

Badania nad koniugatami celującymi w mitochondria jako nowymi środkami przeciwnowotworowymi finansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 21 (nr 2021/41/B/ST4/00088).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Health Organization: International Agency for Research on Cancer [dostęp: 05.08.2022 r.]. Dostępny w Internecie: <https://www.iarc.who.int>.
- [2] World Health Organization: Report on cancer [dostęp: 05.08.2022 r.]. Dostępny w Internecie: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [3] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, *Chem Rev.*, 2009, **109**, 3012.
- [4] B. Das, G. Satyalakshmi, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2012, **9**, 169.
- [5] The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – raporty [dostęp: 05.08.2022 r.]. Dostępny w Internecie: <https://cddep.org>.
- [6] K. Lenert, A. Szyda, M. Kielbasiński, D. Duś, M. Podolak–Dawidziak, *Onkologia w praktyce klinicznej*, t.1, 2005, **1**, 18.
- [7] M. Antoszczak, A. Huczyński, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **176**, 208.
- [8] M. Antoszczak, D. Steverding, A. Huczyński, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **166**, 32.
- [9] J. Rutkowski, B. Brzezinski, *Biomed. Res. Int.*, 2013, **2013**, 31.
- [10] D.A. Kevin II, D.A. Meujo, M.T. Hamann, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2019, **4**, 109.
- [11] M. Mitani, T. Yamanishi, Y. Miyazaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, **66**, 1231.
- [12] Y. Kishi, S. Hatakeyama, M.D. Lewis, *Frontiers of Chemistry*, Oxford 1982, 287.
- [13] M. Jędrzejczyk, J. Janczak, A. Huczyński, *J. Mol. Struct.*, 2022, **1263**, 133129.
- [14] M.E. Yurkovich, P.A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborskyy, K. Kamiya, P.F. Leadley, *Chem. Bio. Chem.*, 2012, **13**, 66.
- [15] M. Suzuki, R. Ueoka, K. Takada, S. Okada, S. Ohtsuka, Y. Ise, S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 1192.
- [16] A. Huczyński, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2012, **79**, 235.
- [17] P. Butaye, L.A. Devriese, F. Haesebrouck, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, **16**, 175.
- [18] J.W. Westley, *Polyether Antibiotics. Naturally Occurring Acid Ionophores*, Vol. 2, Marcel Dekker, New York, 1983, str. 51.
- [19] E. Derrickson-Tharrington, P.A. Kendall, J.N. Sofos, *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **99**, 79.
- [20] A. Ogita, K.I. Fujita, T. Tanaka, *Ann. Microbiol.*, 2009, **59**, 611.
- [21] W. Huang, J. Briffotiaux, X. Wang, L. Liu, P. Hao, M. Cimino, M.V. Buchieri, A. Namouchi, J.A. Ainsa, B. Gicquel, *Tuberculosis*, 2017, **107**, 111.
- [22] J. Stefańska, M. Antoszczak, K. Stepień, M. Bartoszcze, T. Mirski, A. Huczyński, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 2082.
- [23] J.F. Barrett, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2005, **9**, 253.

- [24] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirsoe, *J. Antibiot.*, 1974, **27**, 814.
- [25] M. Antoszczak, A. Huczyński, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **176**, 208.
- [26] J.W. Westley, *Polyether Antibiotics. Naturally Occurring Acid Ionophores*, Vol. 1, Marcel Dekker, New York 1982, str. 120.
- [27] A. Ogita, Y. Konishi, B. Borjihan, K.I. Fujita, T. Tanaka, *J. Antibiot.*, 2009, **62**, 81.
- [28] M. Nakamura, S. Kunimoto, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Sakaue, S. Inoue, T. Ohno, T. Takeuchi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 492.
- [29] Y. Jang, J.S. Shin, Y.S. Yoon, Y.Y. Go, H.W. Lee, O.S. Kwon, S. Park, M.S. Park, M. Kim, *J. Virol.*, 2019, **92**, e01441.
- [30] S. Jeon, M. Ko, J. Lee, I. Choi, S.Y. Byun, S. Park, D. Shum, S. Kim, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2020, **64**, 7.
- [31] M. Dittmar, J. S. Lee, K. Whig, E. Segrist, M. Li, B. Kamalia, L. Castellana, K. Ayyanathan, F. L. Cardenas-Diaz, E. E. Morrissey, R. Truitt, W. Yang, K. Jurado, K. Samby, H. Ramage, D. C. Schultz, S. Cherry, *Cell Rep.*, 2021, **35**, 108959.
- [32] S.D. Folz, B.L. Lee, L.H. Nowakowski, G.A. Conder, *Vet. Parasitol.*, 1988, **28**, 1.
- [33] S. Kadykalo, T. Roberts, M. Thompson, J. Wilson, M. Lang, O. Espeisse, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2018, **51**, 304.
- [34] D. Steverding, M. Antoszczak, A. Huczyński, *Parasit. Vectors*, 2016, **9**, 409.
- [35] C. Gumila, M.L. Ancelin, G. Jeminet, A.M. Delort, G. Miquel, H.J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, **40**, 602.
- [36] S. D'Alessandro, Y. Corbett, D.P. Ilboudo, P. Misiano, N. Dahiya, S.M. Abay, A. Habluetzel, R. Grande, M.R. Gismondo, K.J. Dechering, K.M.J. Koolen, R.W. Sauerwein, D. Taramelli, N. Basilico, S. Parapini, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, **59**, 5135.
- [37] K. Otoguro, A. Kohana, C. Manabe, A. Ishiyama, H. Ui, K. Shiomi, H. Yamada, S. Omura, *J. Antibiot.*, 2001, **54**, 658.
- [38] M. Antoszczak, A. Huczyński, B. Brzezinski, *Wiad. Chem.*, 2017, **71**, 629.
- [39] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, *Nature*, 2001, **414**, 105.
- [40] J.P. Medema, *Nat. Cell Biol.*, 2013, **15**, 338.
- [41] P.B. Gupta, T.T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R.A. Weinberg, E.S. Lander, *Cell*, 2009, **138**, 645.
- [42] M. Antoszczak, A. Huczyński, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2015, **15**, 575.
- [43] C. Naujokat, D. Fuchs, G. Opelz, *Mol. Med. Rep.*, 2010, **3**, 555.
- [44] C. Naujokat, R. Steinhart, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, 2012, 950658.
- [45] S.H. Park, X. Wang, R. Liu, K.S. Lam, R.H. Weiss, *Cancer Biol. Ther.*, 2008, **7**, 2015.
- [46] G.N. Zhang, Y. Liang, L.J. Zhou, S.P. Chen, G. Chen, T.P. Zhang, T. Kang, Y.P. Zhao, *Cancer Lett.*, 2011, **313**, 137.
- [47] M.R. Bardsley, V.J. Horvath, D.T. Asuzu, A. Lorincz, D. Redelman, Y. Hayashi, L.N. Popko, D.L. Young, G.A. Lomberk, R.A. Urrutia, G. Farrugia, B.P. Rubin, T. Ordog, *Gastroenterology*, 2010, **139**, 942.
- [48] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2004.
- [49] T.V. Hansen, P. Wu, W. D. Sharpless, J.G. Lindberg, *J. Chem. Educ.*, 2015, **82**, 1833.
- [50] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, **41**, 2596.
- [51] B.C. Boren, S. Narayan, L.K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 8923.
- [52] M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2952–3015.
- [53] The Royal Swedish Academy of Sciences - The Nobel Prize in Chemistry 2022 [dostęp: 17.10.2022 r.]. Dostępny w Internecie: <https://www.nobelprize.org>.
- [54] M. Antoszczak, M. Kordylas, A. Huczyński, *Wiad. Chem.*, 2018, **72**, 1.



- [55] J.F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 958.
- [56] G.R. Zimmermann, J. Lehra, C.T. Keith, *Drug Discov. Today*, 2007, **12**, 34.
- [57] K. Kacprzak, *Chemistry and biology of Cinchona alkaloids*, [w:] *Handbook of Natural Products – Phytochemistry, Botany, Metabolism*, K.G. Ramawat, J.M. Merillon (Red.), Heidelberg: Springer Berlin, 2013, s. 605.
- [58] E. Solary, L. Mannone, D. Moreau, D. Caillot, R.O. Casasnovas, H. Guy, M. Grandjean, J.E. Wolf, F. André, P. Fenaux, P. Canal, B. Chauffert, A. Wotawa, M. Bayssas, P. Genne, *Leukemia*, 2000, **14**, 2085.
- [59] I. Skiera, M. Antoszczak, J. Trynda, J. Wietrzyk, P. Boratyński, K. Kacprzak, A. Huczyński, *Biol. Drug Des.*, 2015, **86**, 911.
- [60] D.G. Power, N.E. Kemeny, *Mol. Cancer. Ther.*, 2009, **8**, 1015.
- [61] J.K. Podlewski, *Leki współczesnej terapii*. Warszawa: Split Trading Wydawnictwa Fundacji Büchnera, 1995, s. 900.
- [62] A. Huczyński, M. Antoszczak, N. Kleczewska, M. Lewandowska, E. Maj, J. Stefańska, J. Wietrzyk, J. Janczak, L. Celewicz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **93**, 33.
- [63] M. Antoszczak, E. Maj, N. Kleczewska, J. Wietrzyk, L. Celewicz, A. Huczyński, *Med. Chem.*, 2017, **13**, 127.
- [64] M. Rooseboom, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, *Pharmacol. Rev.*, 2004, **56**, 53.
- [65] A.L. Simplicio, J.M. Clancy, J.F. Gilmer, *Molecules*, 2008, **13**, 519.
- [66] S. Wen, D. Zhu, P. Huang, *Future Med. Chem.*, 2013, **5**, 53.
- [67] G. Battogtokh, Y.S. Choi, D.S. Kang, S.J. Park, M.S. Shim, K.M. Huh, Y.Y. Cho, J.Y. Lee, H.S. Lee, H.C. Kang, *Acta Pharm. Sin. B*, 2018, **8**, 862.
- [68] J. Pourahmand, A. Salimi, E. Seydi, *Mitochondrial Targeting for Drug Development, Toxicology Studies – Cells, Drugs and Environment*, 2015, IntechOpen.
- [69] Y.N. Antonenko, M. Jędrzejczyk, T.I. Rokitskaya, L.S. Khailova, E.A. Kotova, A. Huczyński, *Bioelectrochemistry*, 2022, **145**, 108089.
- [70] M. Huang, Z. Deng, J. Tian, T. Liu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **127**, 900.
- [71] (a) E. F. Paulus, M. Kurz, H. Matter, L. Vèrtesy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8209; (b) X. Huang, B. Borgström, L. Mansson, L. Persson, S. Oredsson, C. Hegardt, D. Strand, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 1587.
- [72] M. Sulik, E. Maj, J. Wietrzyk, A. Huczyński, M. Antoszczak, *Biomolecules*, 2020, **10**, 1039.
- [73] B. Li, J. Wu, W. Zhang, Z. Li, G. Chen, Q. Zhou, S. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**, 1624.
- [74] M. Antoszczak, D. Steverding, M. Sulik, J. Janczak, A. Huczyński, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **173**, 90.
- [75] M. Sulik, K. Stępień, J. Stefańska, A. Huczyński, M. Antoszczak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2020, **30**, 127062.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 września 2022 r.

