

KAROLINA HYZ

**SPEKTROSKOPIA NMR INHIBITORÓW POCHODZENIA NATURALNEGO
TOPOIZOMERAZY I I II**

Praca została przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor: Prof. dr hab. Lech Kozerski

A-21-3

A-21-15

K-c-123

K-f-137

Warszawa 2011

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.326/11



90000000128479



B Org. 326/11

Serdecznie dziękuję promotorowi,
Panu Profesorowi Lechowi Kozerskiemu,
za wskazanie interesującego tematu pracy
oraz nieocenione wsparcie podczas jej realizacji.

Dziękuję również
Panu Doktorowi hab. Robertowi Kawęckiemu,
Panu Doktorowi Wojciechowi Bocianowi,
Panu Jerzemu Sitkowskiemu,
Pani Doktor Elżbiecie Bednarek
za pomoc i cenne wskazówki.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i akronimów używanych w tekście.....	7
Nomenklatura, struktura oraz numeracja IUPAC cukrów i zasad w kwasach nukleinowych	9
Rotacyjne parametry helikalne przyjęte przez IUPAC	10
Translacyjne parametry helikalne przyjęte przez IUPAC	11
1. Wstęp.....	12
2. Cel pracy	15
CZĘŚĆ LITERATUROWA	19
3. Struktura i funkcja DNA	19
4. Topoizomerazy.....	29
5. Klasyczne mechanizmy oddziaływania leków z DNA	33
5.1. Związki tworzące kompleksy niekowalencyjne	33
5.1.1. Oddziaływania elektrostatyczne	33
5.1.2. Oddziaływania w dużej i małej bruzdzie	34
5.1.3. Interkalacja pomiędzy pary zasad	35
5.2. Związki alkilujące	36
5.3. Związki przecinające nici DNA	38
6. Inhibitory topoizomerazy I i II	40
6.1. Inhibitory topoizomerazy I	41
6.1.1. Kamptotecyna	41
6.1.2. Najważniejsze pochodne kamptotecyny.....	48
6.1.2.1. Topotekan	48
6.1.2.2. Irinotekan.....	51
6.1.2.3. Exatekan.....	52
6.1.2.4. Gimatekan.....	52
6.1.2.5. Karenitecyna	52
6.1.2.6. Lurtotekan.....	53
6.1.2.8. Rubitekan	53
6.1.2.9. Diflomotekan	54
6.1.2.10. CKD-602	54
6.1.2.11. Protekan	54
6.1.3. Inne inhibitory topoizomerazy I	54
6.2. Inhibitory topoizomerazy II	55
6.2.1. Flawonoidy.....	55

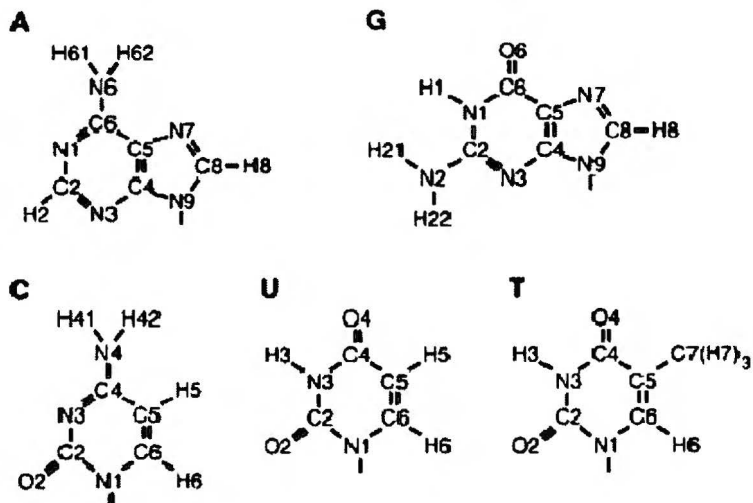
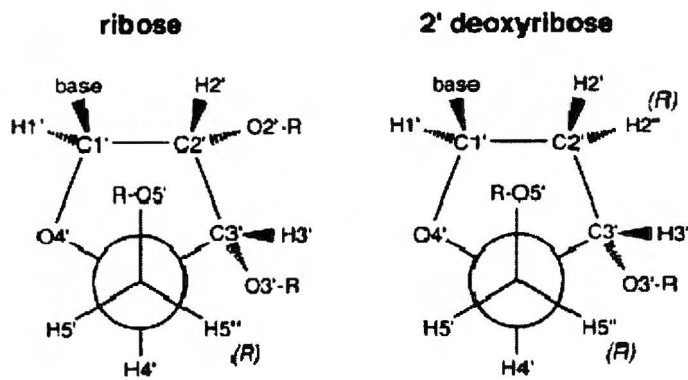
6.2.1.1. Genisteina	58
6.2.1.2. Kwercetyna	60
6.2.2. Inne inhibitory topoisomerazy II	60
6.3. Inhibitory podwójne	60
7. Zastosowanie metod NMR do badania oddziaływań nukleotydów	61
WYNIKI I DYKUSJA	64
8. Zagadnienia inhibicji topoisomerazy I	64
8.1. Charakterystyka topotekanu w środowisku fizjologicznym	64
8.1.1. Czasy relaksacji $^1\text{H-T}_1$ i wzmocnienie NOE	64
8.2. Równowaga i stabilność topotekanu w H_2O , MeOH i DMSO	70
8.3. Synteza pochodnej topotekanu – reakcja czwartorzędowania	75
8.4. Oddziaływania pochodnej topotekanu z DNA	80
9. Zagadnienia inhibicji topoisomerazy II	88
9.1. Badanie modelu szpilki i hantli	88
9.1.1. Wpływ temperatury na równowagę szpilka – hantla	90
9.1.2. Wpływ stężenia dodekameru na równowagę szpilka – hantla	91
9.1.3. Wpływ siły jonowej na równowagę szpilka – hantla	93
9.1.4. Wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego na równowagę szpilka – hantla	94
9.1.5. Obliczenie struktury hantli	100
9.2. Modyfikacje genisteiny	102
9.3. Oddziaływania genisteiny z DNA	103
9.3.1. Oddziaływanie tymidyna – genisteina	103
9.3.2. Wpływ genisteiny na równowagę szpilka – hantla	104
9.3.3. Oddziaływanie pochodnej 2 z motywem szpilki DNA	109
9.3.4. Oddziaływanie pochodnej 3 z motywem hantli DNA	111
10. Podsumowanie	122
10. Część eksperymentalna	125
10.1. Aparatura	125
10.2. Eksperymenty NMR	125
10.3. Przygotowanie próbek	127
10.4. Obliczenie struktury hantli i kompleksu DNA – Gen 3	133
10.5. Uściślenie struktury	133
ZAŁĄCZNIK 1: Wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych	135
LITERATURA	136

Wykaz skrótów i akronimów używanych w tekście

A	Adenozyna, adenina
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
C	Cytydina, cytozyna
COSY	Correlation Spectroscopy
CPT	Kamptotecyna
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
DQF-COSY	Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy
DPFGSE NOE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo Nuclear Overhauser Effect
DPFGSE ROE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo Rotating-frame Overhauser Effect
DS	Double strand
ESI MS	Electrospray Mass Spectroscopy
G	Guanozyna, guanina
GB	Generalized Born model
(G)HMBC	(Gradient) Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
(G)HSQC (AD)	(Gradient) Heteronuclear Single Quantum Coherence (Adiabatic)
LR/HR-MS	High Resolution/Low Resolution Mass Spectroscopy
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MD	Molecular Dynamics
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
QM	<i>o</i> -Quinone Methide
PEG	Poly(ethylene glycol)
ppm	Parts per million

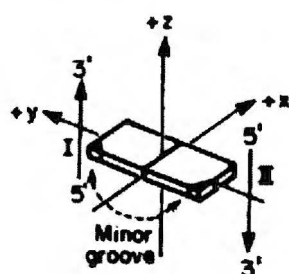
rmsd	Root mean square deviation
ss	Single strand
T	Tymidyna, tymina
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Topo I, II	Topoizomeraza I, II
TPT	Topotekan
TSP- d_4	3-(Trimethylsilyl)propionic acid- d_4 sodium salt
UV	Ultraviolet

Nomenklatura, struktura oraz numeracja IUPAC cukrów i zasad w kwasach nukleinowych ¹

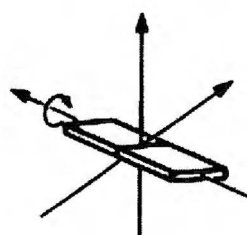


Rotacyjne parametry helikalne przyjęte przez IUPAC (konwencja Cambridge)²

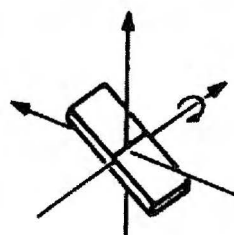
W dwóch górnych rzędach pokazano parametry rotacyjne występujące pomiędzy dwiema zasadami jednej pary; w dolnym rzędzie pokazano parametry rotacyjne pomiędzy dwiema kolejnymi parami zasad.



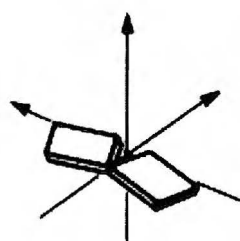
Coordinate frame



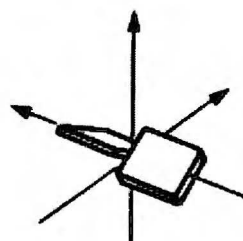
Tip (θ)



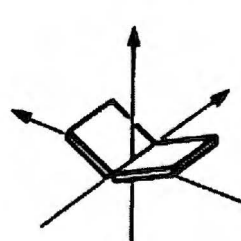
Inclination (η)



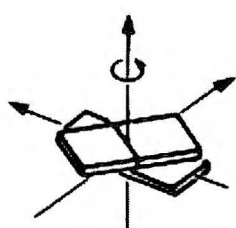
Opening (σ)



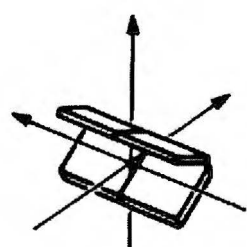
Propeller twist (ω)



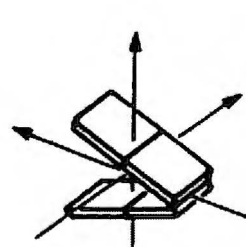
Buckle (κ)



Twist (Ω)



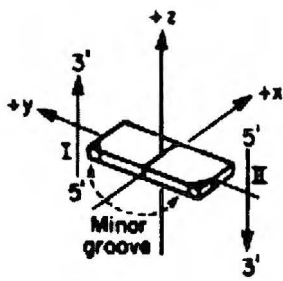
Roll (ρ)



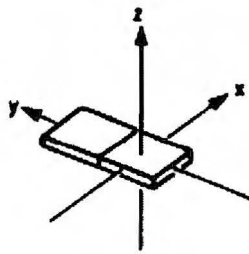
Tilt (τ)

Translacyjne parametry helikalne przyjęte przez IUPAC (konwencja Cambridge) ²

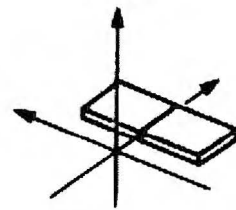
W dwóch górnych rzędach pokazano parametry translacyjne występujące pomiędzy dwiema zasadami jednej pary; w dolnym rzędzie pokazano parametry translacyjne pomiędzy dwiema kolejnymi parami zasad.



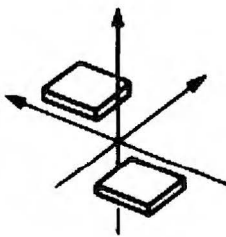
Coordinate frame



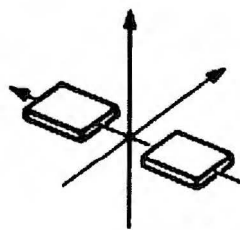
y displacement (dy)



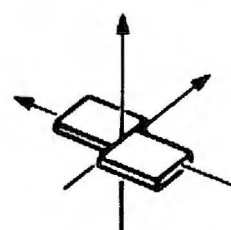
x displacement (dx)



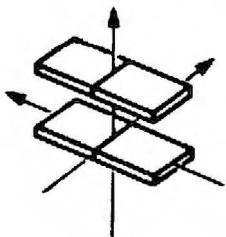
Stagger (Sz)



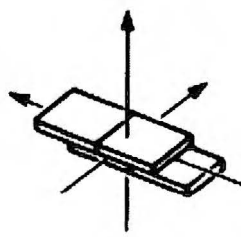
Stretch (Sy)



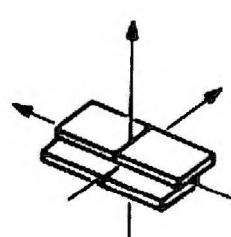
Shear (Sx)



Rise (Dz)



Slide (Dy)



Shift (Dx)

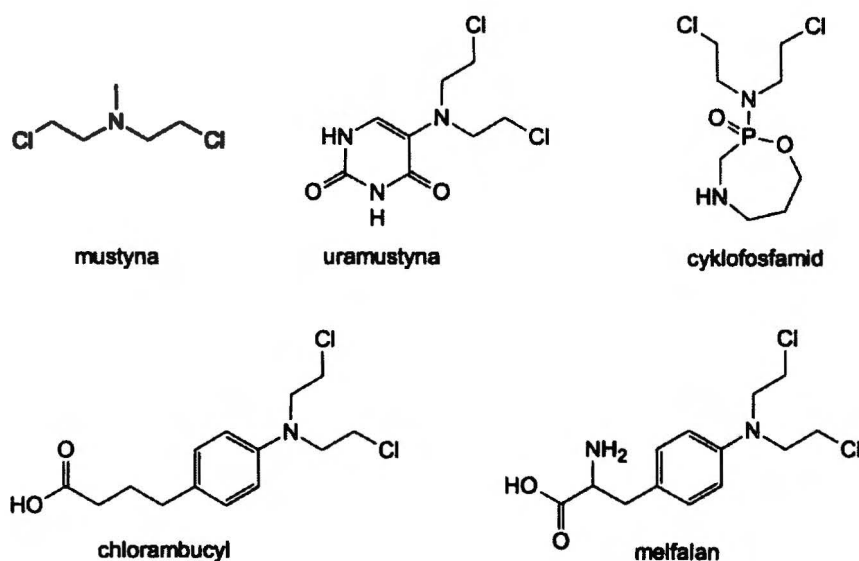
1. Wstęp

Choroby nowotworowe są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie; w 2008 roku przyczyniły się do śmierci 7.6 miliona ludzi (13% wszystkich zgonów na świecie), prognozy przewidują ponad 11 milionów zgonów w 2030 roku. Można wyróżnić ponad 100 rodzajów nowotworów, w zasadzie każdy organ ludzkiego ciała może zostać zaatakowany. Ponad 70% wszystkich zgonów z powodu raka ma miejsce w krajach średnio rozwiniętych, do których zalicza się również Polskę. Nowotwory powodujące największą liczbę zgonów wśród kobiet to: rak piersi, rak płuc, rak żołądka, rak jelita grubego, rak szyjki macicy; wśród mężczyzn są to: rak płuc, rak żołądka, rak wątroby, rak jelita grubego i rak przełyku. Palenie tytoniu jest największym czynnikiem ryzyka będącym przyczyną chorób nowotworowych na świecie. 20% zachorowań spowodowanych jest chronicznymi infekcjami wirusowymi takimi jak HPV czy HBV. Szacuje się, że jednej trzeciej zachorowań można by zapobiec stosując odpowiednią profilaktykę (niepalenie tytoniu, zdrowa dieta, aktywność fizyczna, szczepienia). Wcześniejsze wykrywanie i leczenie mogłoby obniżyć śmiertelność również o jedną trzecią.³

Trudno precyzyjnie określić datę rozpoczęcia leczenia nowotworów, ponieważ już od starożytności stosowano zioła i inne preparaty. Rozwój zaawansowanych terapii rozpoczął się w latach 90-tych XIX wieku i trwa do dziś. Jednym z pierwszych wydarzeń, które umożliwiło leczenie nowotworów było odkrycie przez Wilhelma Roentgena promieniowania X. Umożliwiło to rozwój radioterapii, a także rozpoczęcie badań nad lekami, które naśladowałyby efekty naświetlania. Odkrycie w 1896 przez Georgea Beatsona faktu, że rozwój raka piersi może być zatrzymany przez wycięcie jajników wskazywało na to, że czynniki zewnętrzne mogą wpływać na postęp choroby nowotworowej. W 1898 William Coley dowiódł, że podanie pacjentom ekstraktu bakteryjnego powoduje regresję chłoniaków i mięsaków. Na początku XX wieku Paul Ehrlich postawił hipotezę, że związki o małej masie cząsteczkowej mogą być stosowane w leczeniu nowotworów równie skutecznie, jak w leczeniu infekcji.⁴

Pierwsze leki przeciwnowotworowe o praktycznym zastosowaniu zostały odkryte przypadkowo. Autopsja żołnierzy zabitych gazem musztardowym w czasie I Wojny Światowej wykazała między innymi leukopenię (obniżenie poziomu leukocytów) i aplazję szpiku. Wskazywało to na istotny wpływ gazu musztardowego na szybko dzielące się komórki i sugerowało, że mógłby być efektywny w terapii nowotworowej. Okazało się jednak, że toksyczność tego związku była zbyt duża. W czasie II Wojny Światowej w Bari miał miejsce przeciek przechowywanych tam pojemników zawierających iperyt azotowy. U ludzi wystawionych na jego działanie również zaobserwowano leukopenię. W latach 40-tych XX wieku

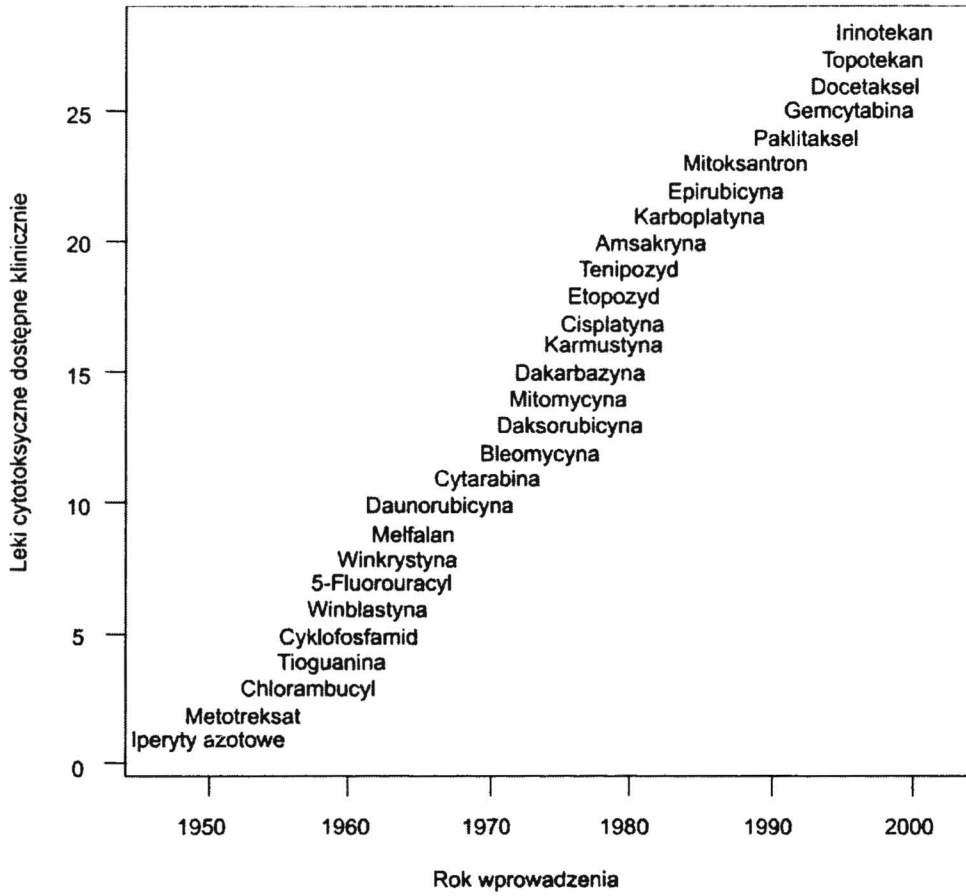
Przeprowadzono pierwsze testy kliniczne z wykorzystaniem pochodnej iperytu azotowego, mechloretaminy (mustyny) i to wydarzenie uważa się za początek nowoczesnej chemioterapii. Sama mustyna nie jest już używana w leczeniu, ale inne pochodne iperytów azotowych wciąż jeszcze tak (cyklofosfamid, chlorambucyl, uramustyna, melfalan) (rysunek 1.1).^{4,5}



Rysunek 1.1. Iperyty azotowe stosowane w terapiach nowotworowych.

Wymienione związki reagują z DNA, dlatego zdefiniowanie struktury DNA na poziomie atomowym w 1953 roku miało istotny wpływ na rozwój strategii przeciwnowotworowych. Kolejne dekady przyniosły ogromny wzrost liczby nowych leków, które wchodziły do powszechnego użycia średnio co 2 lata (rysunek 1.2).

Można wyróżnić trzy główne klasy związków oddziałujących z DNA: związki tworzące z DNA kompleksy niekowalencyjne, związki alkilujące i związki powodujące pęknięcia nici DNA, jednak obecnie jednym z podstawowych trendów terapeutycznych stosowanych w medycynie w leczeniu nowotworów jest wykorzystanie inhibitorów topoizomeraz I (topo I), i II (topo II).^{6, 7, 8} Można sądzić, że ten kierunek chemioterapii będzie rozwijał się najbardziej dynamicznie, ze względu na wysoką specyficzność inhibitorów topo wobec komórek intensywnie dzielących się.



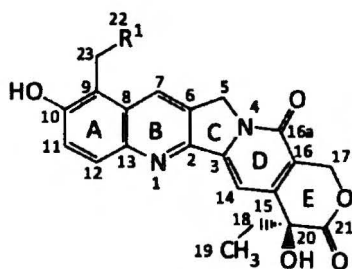
Rysunek 1.2. Chronologia pojawiania się leków przeciwnowotworowych. ⁴

2. Cel pracy

Cele pracy można rozdzielić na wątki dotyczące topoizomerazy I i II. Do badania zagadnień związanych z topo I wybrano związki z grupy kamptotecyn, a do zagadnień związanych z topo II związki z grupy flawonoidów.

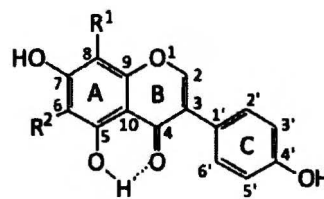
topo I

1) Jeśli chodzi o zagadnienia inhibicji topoizomerazy I, to pierwszoplanowym celem było opisanie dynamiki topotekanu w roztworze. Topotekan (TPT, Hycamtin[®], schemat 2.1), stosowany w formie chlorowodoru, jest administrowanym klinicznie lekiem na nowotwór piersi, dlatego zbadanie jego zachowania w środowisku fizjologicznym ma duże znaczenie biologiczne.




$R^1 = -HNMe_2^+ Cl^-$ (chlorowodorek topotekanu),
 $-OMe, -OH, -NMe_3^+ X^-$

$X^- = I^-, SO_2OCH_3^-, SO_2OCF_3^-$

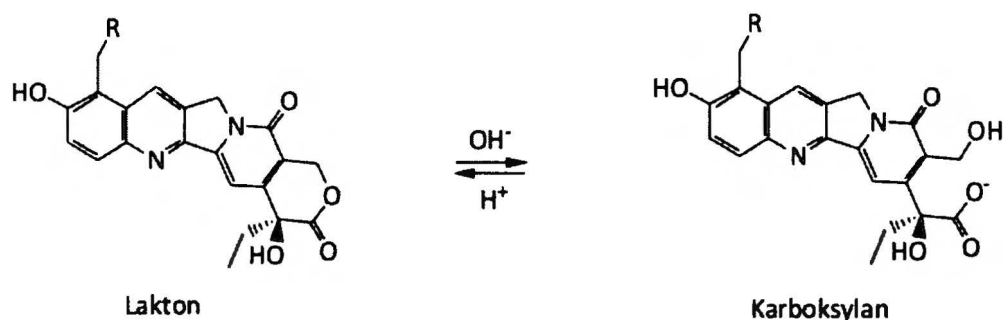


$R^1, R^2 = -H$ (genisteina),

$-CH_2NMe_2, -CH_2-N$ 

Schemat 2.1. Planowane do badań pochodne kamptotecyny i genisteiny.

2) Jednym ze szczegółowych punktów badań było badanie tautomerii TPT i nowootrzymany pochodnych w celu wyjaśnienia wszystkich procesów prototropowych możliwych w cząsteczce. Chociaż TPT jest stosowany w leczeniu klinicznym od kilkunastu lat, tautomeria tego alkaloidu nie jest w pełni opisana. Podstawowa, znana równowaga lakton - karboksylan (schemat 2.2) dotyczy zależnej od pH transformacji formy laktonowej do karboksylanowej.



Schemat 2.2. Równowaga lakton – karboksylan w kamptotecynach.

3) Planowano syntezę nowych pochodnych TPT oraz scharakteryzowanie ich metodami spektroskopowymi. Związki te przedstawiono na schemacie 2.1. Były to: elektrycznie obojętne czwartorzędowe sole amonowe z różnymi przeciwjonami (I^- , $CH_3SO_3^-$, $CF_3SO_3^-$), pochodna zawierająca w pozycji C-23 grupę metoksyłową oraz pochodna z grupą hydroksyłową w pozycji C-23. W bazie planowanych pochodnych w tej grupie znalazły się związki z objętościowo mniejszym (OH) lub większym podstawnikiem (N^+Me_3 $CF_3SO_3^-$).

Planowano również zbadanie sposobów oddziaływania wybranych związków z DNA. W szczególności chodziło o czwartorzędową sól TPT, w której eliminacja grupy NMe_3^+ , prowadzi do związku typu QM („*o*-quinone methide”). Takie związki reagują z centrami nukleofilowymi zasad w DNA. Najnowsze badania wskazują na możliwość występowania równowagi multikonformacyjnej w przypadku wiązania się związków QM z oligomerami DNA ⁹.

topo II

- 1) Jeśli chodzi o zagadnienia inhibicji topoizomerazy II, to w pierwszej kolejności planowano opracowanie ogólnego modelu motywu hantli, umożliwiającego badanie oddziaływań inhibitorów topo II z DNA. Należało tu opracować nie tylko strukturę oligomeru DNA, ale również warunki eksperymentalne pozwalające na badanie ewentualnych oddziaływań z inhibitorami. Ważnym elementem było obliczenie struktury metodami dynamiki molekularnej.
- 2) Następnym etapem było zaprojektowanie i otrzymanie nowych pochodnych genisteiny. Ponieważ sama genisteina jest bardzo słabo rozpuszczalna w medium fizjologicznym, planowano zastosowanie związków o zwiększonej rozpuszczalności: podstawionych w

pierścieniu A grupą alkilo-N,N-dimetylamino w położeniu 6 i 8 (w formie chlorowodoru), bądź podstawnikami morfolinowymi w położeniu 6 i 8 (schemat 2.1).

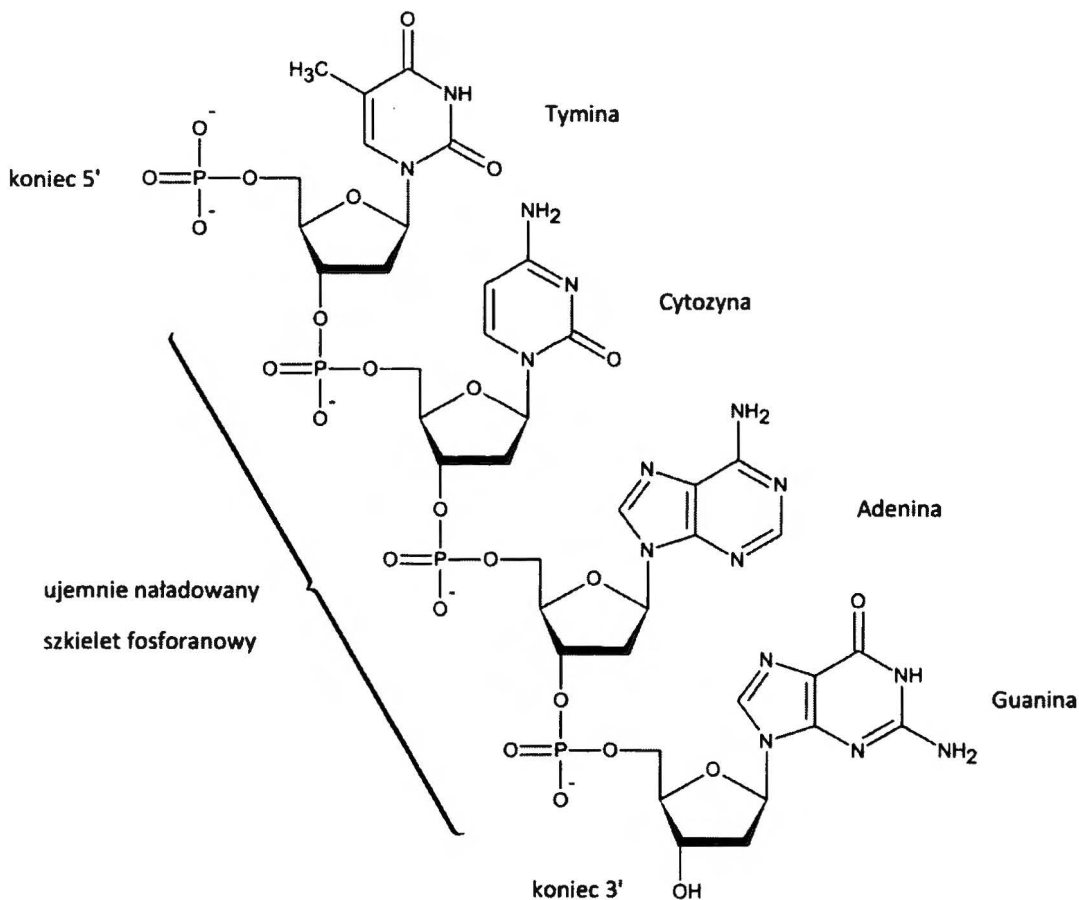
- 3) Ostatecznie, posługując się bazą związków z grupy flawonoidów przedstawioną na schemacie 2.1, zaplanowano zbadanie sposobów oddziaływania z biocząsteczkami wybranych ligandów, spełniających warunki dobrej rozpuszczalności w medium fizjologicznym. W szczególności chodziło o wyznaczenie stałych asocjacji w kompleksie z DNA oraz stwierdzenie selektywności wiązania liganda w przerwie w DNA, zdefiniowanej przez działanie topo II. Zidentyfikowanie typu oddziaływania izoflawonów z oligomerami DNA jest jednym z najmniej opisanych zjawisk w literaturze dla tej grupy związków. Wydaje się, że implikacje wyjaśnienia działania genisteiny jako inhibitora topo II są nieporównywalnie większe dla poznania mechanizmu genezy nowotworów piersi, niż dla każdego innego leku z tej kategorii. Wynika to z faktu, że jest to związek naturalny, występujący w diecie bogatej w produkty sojowe (o dużej zawartości flawonoidów) i dotyczy ogromnej populacji kobiet w Azji, u których znacznie rzadziej diagnozowany jest rak piersi niż u Europejki i Amerykanek.¹⁰

Zadania były realizowane z wykorzystaniem technik NMR, w szczególności analizy zmian wartości przesunięć chemicznych, analizy sygnałów korelacyjnych oraz wyznaczania współczynnika dyfuzji. Wykorzystano także metody dynamiki molekularnej do obliczenia struktur wybranych nukleotydów.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

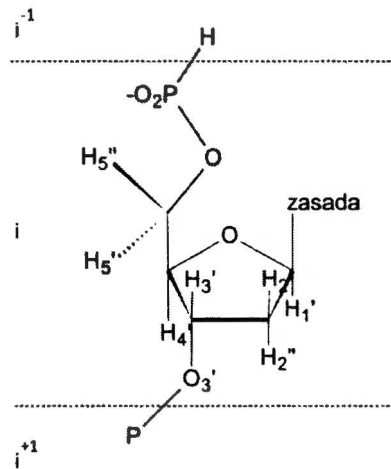
3. Struktura i funkcja DNA

DNA, czyli kwasy deoksyrybonukleinowe, to liniowe polimery, w których fragmentem powtarzającym się są nukleotydy. Każdy nukleotyd składa się z cukru (β -2-deoksy-D-rybofuranozy, nazywanej dla uproszczenia deoksyrybozą), reszty kwasu fosforowego oraz zasady. Pierwszy atom węgla w deoksyrybozie połączony jest wiązaniem glikozydowym z zasadą azotową, natomiast grupa hydroksylowa jest połączona wiązaniem estrowym z resztą kwasu fosforowego (rysunek 3.1).



Rysunek 3.1. Budowa pojedynczej nici DNA.¹¹

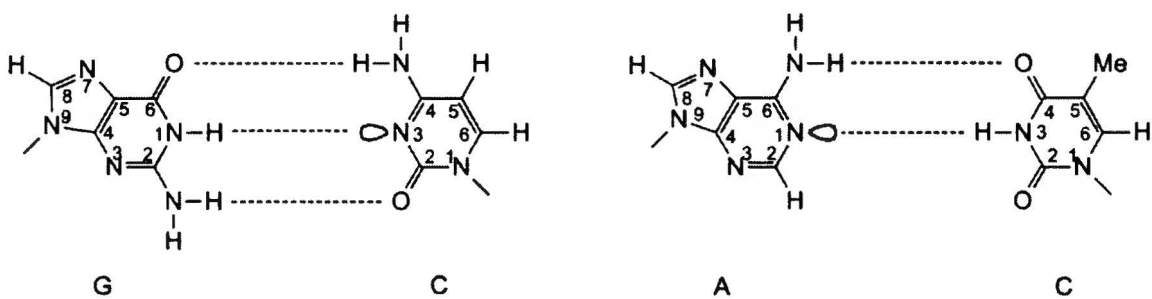
Łańcuch cukrów połączonych mostkami fosfodiestrowymi nazywany jest rdzeniem (szkieletem) kwasu nukleinowego. Podczas gdy rdzeń jest stały, zasady różnią się w poszczególnych monomerach. Protony deoksyrybozy oznaczone są cyframi od 1' do 5' oraz 5''. Kolejność zasad zapisuje się w kierunku 5' → 3' (rysunek 3.2).



Rysunek 3.2. Numeracja protonów deoksyrybozy.¹²

Każdy mostek fosfodiestrowy ma ujemny ładunek, który odpycha grupy nukleofilowe (np. grupę hydroksylową). Ma to wpływ na mniejszą podatność wiązań fosfodiestrowych na atak nukleofilowy, niż w przypadku np. estrów kwasów karboksylowych.

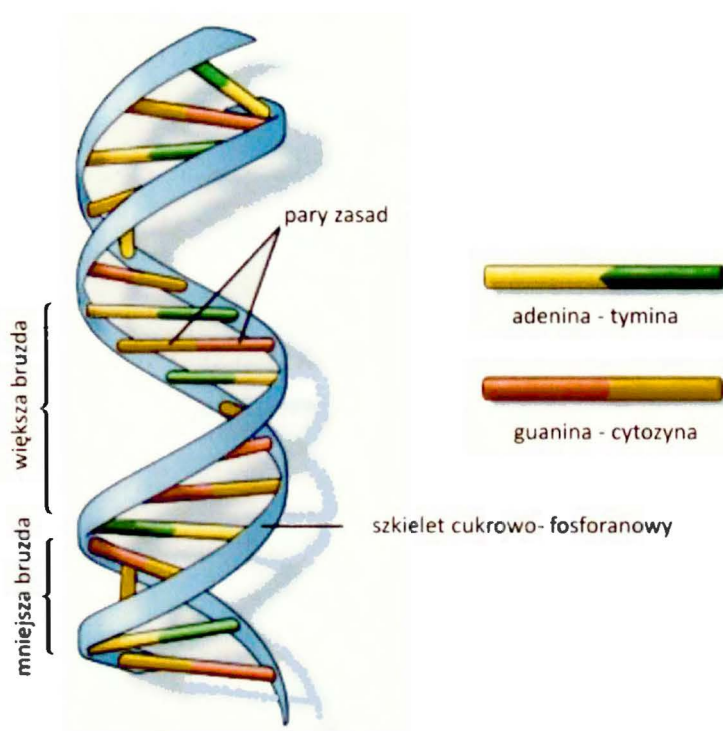
W DNA są cztery rodzaje zasad: puryny - adenina (oznaczana literą A) i guanina (G), a także pirymidyny - cytozyna (G) i tymina (T) (rysunek 3.3). Ich sekwencja w łańcuchu koduje informację genetyczną i wyznacza pierwszorzędową strukturę DNA. Dzięki zróżnicowanemu rozmieszczeniu grup donorowych (protony grup aminowych) i akceptorowych (karbonylowe atomy tlenu i atomy azotu w pierścieniu) tworzących wiązania wodorowe, możliwe jest specyficzne parowanie zasad wg Watsona – Cricka: guaniny z cytozyną a adeniny z tyminą (rysunek 3.3).



Rysunek 3.3. Pary Watsona – Cricka tworzone przez zasady w DNA.

Możliwe jest również parowanie w inny sposób: odwrócone pary Watsona – Cricka, pary Hoogsteena, odwrócone pary Hoogsteena itp. Pary zasad o zasadniczo tym samym kształcie pozwalają na utworzenie regularnej struktury helikalnej (rysunek 3.4), składającej się z dwóch antyrównoległe ułożonych nici kwasu nukleinowego (jedna nić zorientowana jest w kierunku 5'

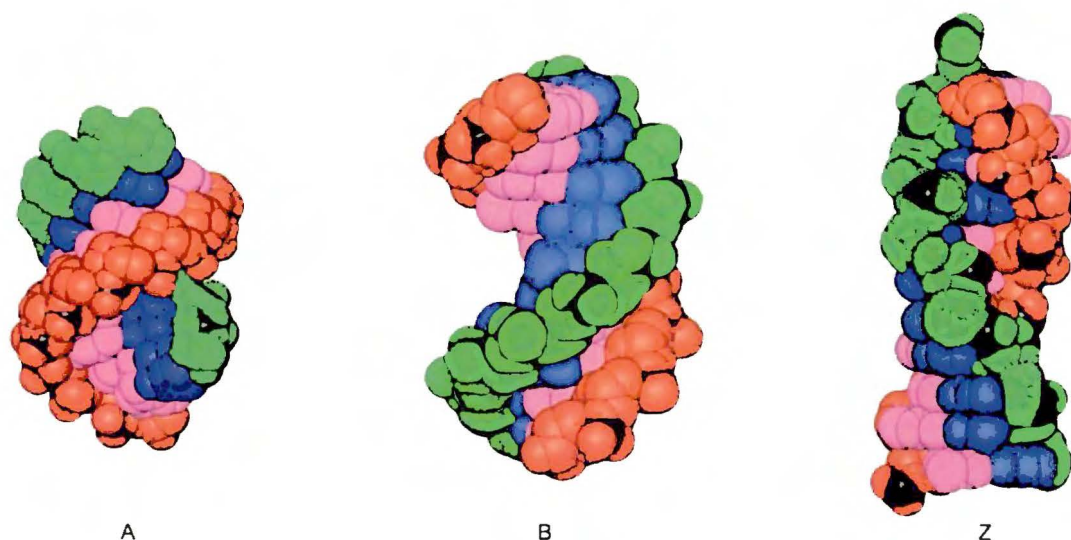
→ 3', a druga w kierunku 3' → 5'). Taki dupleks jest najbardziej popularną drugorzędową strukturą DNA.



Rysunek 3.4. Podwójna helisa DNA.¹³

Trwałość dwuniciowej helisy zapewniają wiązania wodorowe pomiędzy parami zasad, oddziaływania typu π sprzężonych pierścieni („stacking”), a także oddziaływania hydrofobowe między nimi, powodujące zwrócenie powierzchni o charakterze polarnym w kierunku środowiska wodnego. Aromatyczność pierścieni sprawia, że zasady są płaskimi, sztywnymi cząsteczkami. Planarność jest ważnym czynnikiem organizacji zasad, ponieważ umożliwia jednolite ułożenie zasad wewnątrz helisy. Brak grupy 2'-hydroksylowej w reszcie cukrowej jeszcze bardziej zwiększa odporność DNA na hydrolizę. Jest to niezbędne do utrzymania integralności informacji, której źródłem jest DNA. Rozplatanie podwójnej helisy nazywane jest topnieniem, ponieważ w określonej temperaturze przebiega w sposób nagły. Za temperaturę topnienia uznaje się temperaturę, w której dochodzi do utraty połowy helikalnej struktury. Proces ten można śledzić poprzez pomiar absorpcji światła $\lambda = 260$ nm, ponieważ warstwowa asocjacja zasad jest powodem mniejszej absorbancji w helisie dwuniciowej niż w pojedynczej (hipochromizm).¹⁴

Dupleksy kwasów nukleinowych charakteryzuje jedna z trzech form helisy: A, B lub Z (rysunek 3.5).



Rysunek 3.5. Prezentacja promieni Van der Waalsa różnych form podwójnej helisy DNA, zbudowanej z 10 par zasad. Atomy szkieletów cukrowo-fosforanowych zaznaczono na czerwono i zielono, odpowiadające im zasady na różowo i niebiesko. Atomy fosforu zaznaczono czarnym kolorem.¹⁵

Forma A dominuje w warunkach ograniczonej hydratacji, tj. strukturach krystalicznych lub roztworach wodno-alkoholowych, faworyzowana jest również dla sekwencji bogatych w pary GC. W roztworach wodnych jest generalnie mniej stabilna od formy B (w przypadku RNA sytuacja jest odwrotna). A-DNA jest antyrównoległą, prawoskrętną podwójną helisą o średnicy 24 Å. Pierścienie cukrowe są równoległe do osi helisy, a rdzeń fosforanowy znajduje się na zewnątrz.¹⁵

Helisa B jest najczęściej przyjmowaną formą DNA oraz hybryd DNA/RNA i dominuje w roztworach wodnych DNA. Dla RNA jest niedostępna, ze względu na specyficzne ułożenie rybozy.¹⁶ W tej formie pary zasad leżą dokładnie na osi helisy, dlatego mniejsza i większa bruzda mają podobną głębokość.¹⁵

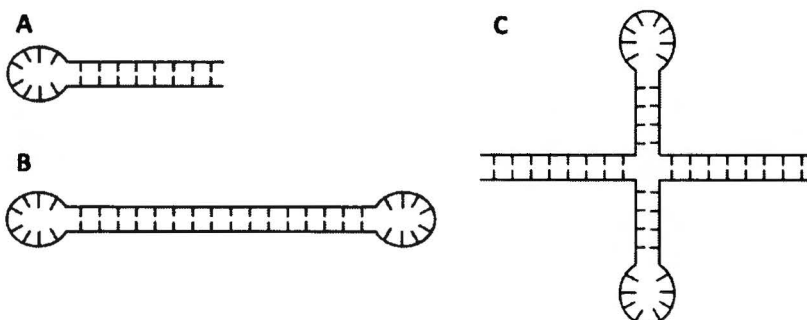
Forma Z występuje sporadycznie w DNA, zwłaszcza w sekwencjach bogatych w pary GC, z podstawnikami w pozycji 5 cytozyny, przy wysokim stężeniu soli oraz sekwencjach z zaburzonym parowaniem zasad.¹² Zdecydowanie różni się od pozostałych helis - jest lewoskrętna, a jednostką powtarzającą się w nici są dwie zasady: puryna + pirymidyna. Puryny występują w konformacji *syn*, a pirymidyny w *anti* – prowadzi to do zygakowatej struktury (stąd nazwa Z-DNA). Parametry helis A, B i Z przedstawione są w tabeli 3.1.

parametr helisy	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
kierunek skręcania	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna
ilość zasad na 1 obrót	10.9	10.0	12.0
mniejsza bruzda	bardzo głęboka	głęboka, szeroka	płytko
większa bruzda	płytko	głęboka, wąska	bardzo głęboka
skok helisy	31.6 Å	34.0 Å	45.6 Å

Tabela 3.1. Wybrane parametry podwójnej helisy DNA.^{12, 15}

Wraz z możliwością uzyskiwania struktur o coraz większej rozdzielczości, idea trzech form helisy DNA osłabła. Obecnie przyjmuje się, że występują lokalne, zależne od sekwencji, różnice w strukturach, związane głównie ze zmianami orientacji w zasadach. Zmiany te mają na celu minimalizację oddziaływań innych niż przez wiązanie z sąsiadującymi zasadami oraz maksymalizację oddziaływania typu „base stacking”. Jest to możliwe dzięki względnie elastycznemu rdzeniowi cukrowo-fosforanowemu.¹⁵

Cząsteczki kwasów nukleinowych często ulegają zwinięciu do form innych niż duplekisy. Powszechnie spotykane motywy to: szpilki, hantle, formy w kształcie krzyża, struktury trójniciowe, struktury Hollidaya, *i*-motywy, potrójne helisy, G-kwadrupleksy itp.¹⁷ Dzięki dobrze zdefiniowanej strukturze, wiele z tych form zostało szczegółowo zbadanych. Motywy krzyżowe, szpilki i hantle (rysunek 3.6) występują jako konsekwencja odwróconych powtórzeń w pojedynczej nici DNA i odgrywają szczególną rolę przy rekombinacji. W potrójnych helisach trzecia nić układa się w większej bruzdzie dupleksu DNA. Stabilność i specyficzność tych układów jest osiągana dzięki parowaniu Hoogsteena. Ponieważ puryny mogą tworzyć wiązania wodorowe z zasadami trzeciej nici, układy trójniciowe powstają we fragmentach bogatych w puryny.¹⁸ G-kwadrupleksy zbudowane są z płaskich G-kwartetów (układów czterech guanin połączonych ośmioma wiązaniami wodorowymi), ułożonych jeden nad drugim. Stabilność takich układów zależy od obecności monowalencyjnego kationu (K^+ , Na^+).¹⁹

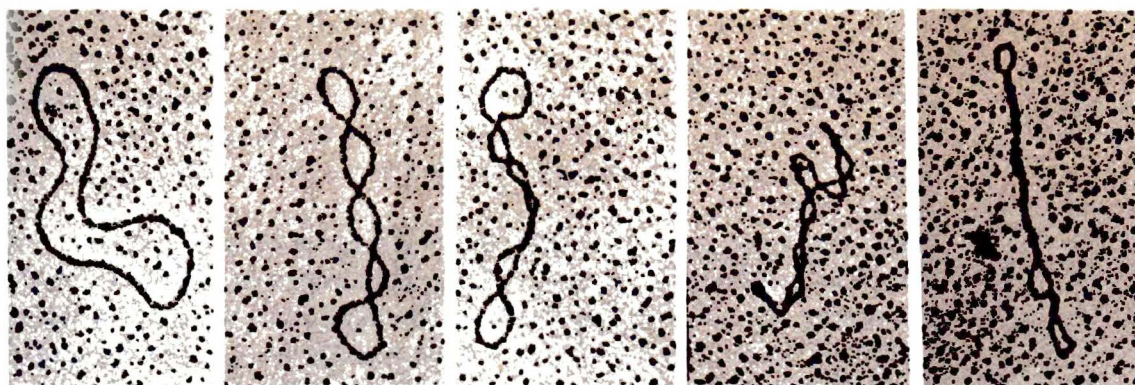


Rysunek 3.6. Motywy DNA: A – szpilka, B – hantla, C – forma krzyżowa.

Układy DNA przybierające strukturę szpilki występują często we fragmentach DNA pełniących określone funkcje, np. w promotorach czy regulatorach. G-kwadrupleksy występują między innymi w telomerach, aptamerach trombiny.²⁰ Sugeruje to, że obecność takich form ma istotne znaczenie w procesach biologicznych z udziałem DNA. Z tego powodu fragmenty kwasów nukleinowych o określonej strukturze, mogących tworzyć szpilki,^{21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29} czy hantle^{30, 31, 32, 33} były wielokrotnie przedmiotem badań. Wynika z nich, że maksymalną stabilność struktury szpilki osiągają oligomery, w których „pętla” zbudowana jest z czterech lub pięciu nukleotydów; rodzaj zasady w pętli też wpływa na tę równowagę. Stabilność poprawia również obecność par GC w części hantli zawierającej dupleks. Pojawiły się również prace, w których omawiana pętla składała się z łańcuchów polimerowych, np. poli(glikolu etylenowego).^{34, 35, 36} Taki łańcuch wybrano ze względu na fakt, że zapewniał dużą mobilność obu części oligonukleotydu oraz jego rozpuszczalność, wynikającą z obecności atomów tlenu. Prace te dotyczą jednak wyłącznie syntetycznych nukleotydów.

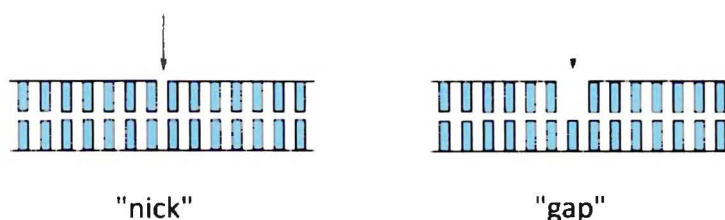
Trzeciorzędowa struktura DNA opisuje, między innymi, splecenie się podwójnej helisy wewnątrz cząsteczki. Cząsteczki DNA mogą być liniowe (np. u człowieka), lub koliste (kowalencyjnie zamknięte tzn. ich łańcuch jest ciągły; np. u bakterii). W obu formach może następować spiralizacja osi podwójnej helisy i utworzenie struktury superhelikalnej (tak zwanej superhelisy) (fotografia 3.1).³⁷ Tego rodzaju formy są dużo bardziej zwarte niż DNA tej samej długości w formie zrelaksowanej.

Cząsteczki superhelikalne występują w większości chromosomów i odgrywają szczególną rolę w wielu układach biologicznych. Stopień skręcenia jest istotnym czynnikiem w etapach replikacji, transkrypcji i rekombinacji. Podstawową właściwością topologiczną cząsteczki kolistego DNA jest liczba opleceń, Lk , która określa, ile razy nić DNA owija się prawoskrętnie wokół osi helisy. Cząsteczki różniące się wyłącznie Lk nazywane są izomerami topologicznymi (topoizomerami). Są one identyczne pod względem topologicznym, lecz różne geometrycznie: mają różną liczbę skrętów, Tw (opisuje helikalne wzajemne skręcenie pojedynczych nici względem siebie) i liczbę zwojów, Wr (odzwierciedla zwinięcie osi dwuniciowej helisy). Dodatnie wartości Wr są charakterystyczne dla nici zwiniętych lewoskrętnie, a ujemne dla zwiniętych prawoskrętnie. Większość natywnych superhelis DNA jest zwinięta ujemnie, ponieważ takie formy są lepiej przygotowane do replikacji.¹⁴ Zmiana konformacji topoizomerów jest możliwa tylko przez rozcięcie jednej lub dwóch nici i ponowne ich połączenie, co odbywa się dzięki obecności enzymów.



Fotografia 3.1. Mikrografie elektronowe kolistego DNA pokazujące stopień skręcenia: od całkowicie zrelaksowanej (pierwsza z lewej) do ciasno skręconej (pierwsza z prawej).³⁷

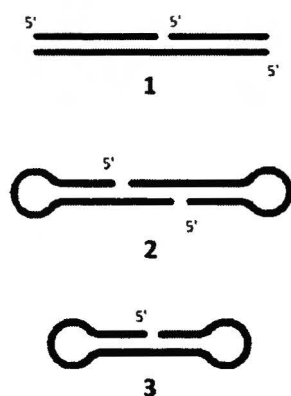
W naturze często spotyka się uszkodzone sekwencje DNA, zawierające różnego rodzaju przerwy: „nick” (pęknięcie wiązania fosfodiesterowego między kolejnymi zasadami) lub „gap” (brak jednego nukleozydu w podwójnej helisie) (rysunek 3.7). Są one wynikiem fragmentacji DNA na skutek różnych procesów enzymatycznych w komórce, np. działania topoiomeraz, endonukleaz, glikozylaz czy niektórych antybiotyków.³⁸



Rysunek 3.7. Przerwy typu „nick” i „gap” w sekwencjach DNA.

Do badań NMR tego rodzaju struktur wykorzystuje się trzy podstawowe modele (rysunek 3.8). Podstawowy układ składa się z długiej nici oligonukleotydu połączonej z dwoma krótszymi komplementarnymi fragmentami (1 na rysunku 3.8).³⁹ Pomimo swojej prostoty, model ten ma dwie podstawowe wady: możliwość innego niż zakładane sparowania nici oraz „postrzępione” końce, ze względu na dynamikę parowania zasad („fraying”). Te niedostatki mogą być wyeliminowane przez użycie układu typu hantli: jedno- lub dwucząsteczkowych. Dwucząsteczkowe hantle składają się z dwóch identycznych szpilek z komplementarnymi zasadami (2 na rysunku 3.8). Na widmie NMR takiego modelu ilość sygnałów jest ograniczona, ze względu na symetrię układu.⁴⁰ Wpływ zaburzenia struktury jednej nici na drugą jest znikomy, ponieważ obie przerwy są od siebie odległe o 4-6 par zasad. Hantle jednocząsteczkowe stanowi

ojedyncza nić o układzie zasad umożliwiającym zwiniecie się w hantlę (3 na rysunku 3.8). Z odpowiednim łącznikiem układ ten zachowuje się jak nieskończenie długi dupleks z pojedynczą przerwą, co eliminuje uwzględnienie wpływu oddziaływań pomiędzy dwoma uszkodzeniami, jak ma to miejsce w przypadku hantli 2.³⁸



Rysunek 3.8. Modele DNA stosowane w NMR do badań uszkodzonych sekwencji.³⁸

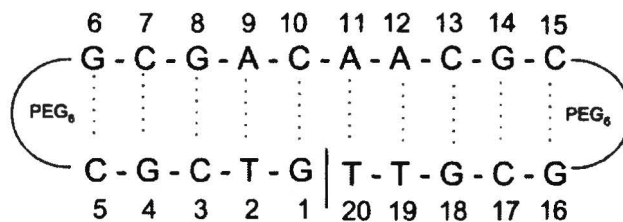
Odwrotnie niż oczekiwano, wstępne badania takich dupleksów pokazały, że obecność przerwy typu „nick” nie wpływa znacząco na wzrost giętkości DNA, sugerując, że dupleks w okolicy uszkodzenia zachowuje uporządkowaną strukturę.⁴¹ Późniejsze analizy NMR potwierdziły to przypuszczenie. Przypisania protonów iminowych na widmie wskazywały, że pary Watsona – Cricka są zachowane dla wszystkich nieterminalnych par zasad uszkodzonego dupleksu.³⁹ Dodatkowo, stwierdzono obecność kluczowych oddziaływań NOE pomiędzy protonami zasady a protonami cukrowymi, charakterystycznych dla helisy B-DNA. Na widmach ³¹P NMR obserwowano niewielką dyspersję przesunięć chemicznych – także charakterystyczną dla regularnej formy B-DNA.³⁸ Bezpośrednie porównanie hantli z przerwami „nick” oraz nieuszkodzonego dupleksu o tej samej sekwencji zasad wykazało zbliżone intensywności sygnałów korelacyjnych NOE pomiędzy protonami zasady i cukru dla odpowiednich nukleotydów, co sugeruje, że lokalne różnice konformacji są niewielkie. Dodatkowo, fosforylacja na końcu 5’ przerwy „nick” nie wpłynęła znacząco na strukturę, powodując jedynie niewielkie zmiany odległości, oszacowane przez autorów na < 1 Å pomiędzy protonami aromatycznymi otaczającymi „nick”.⁴⁰ Protonowe widma NMR wszystkich sekwencji mimikujących przerwę „nick” przebadanych do tej pory, wykazują minimalne poszerzenie i umiarkowane przesunięcie w górę pola sygnałów protonów iminowych dla zasad otaczających przerwę, co wskazuje na częściowe „postrzępienie dupleksu” od strony przerwy („fraying”).^{17, 42, 43, 44} Na widmach temperaturowych widać, że sygnały protonów iminowych otaczających „nick” oraz protonów

Wychodzących od wewnętrznych zasad znikają równocześnie, dowodząc, że hantla topi się wspólnie.

Inaczej niż dla DNA z przerwami „nick”, nie można, bez naruszenia zmiany szkieletu cukrowo-fosforanowego, zaproponować dobrego modelu DNA z przerwami „gap”. Wyniki elektroforezy żelowej przewidują większą mobilność konformacyjną dupleksów z przerwą „gap” niż „nick”.⁴¹ Porównanie widm NMR dupleksu „gap” z „osieroconą” guaniną (tzn. z usuniętą komplementarną do niej cytozyną) i dupleksu „nick” o tej samej sekwencji wskazuje, że protony iminowe sąsiadujących z przerwą guanin oraz protony aminowe komplementarnych do nich cytozyn tworzą normalne pary Watsona – Cricka.⁴² Trudno jednak na tej podstawie wyciągać ogólne wnioski, ponieważ własności modelu zależą silnie od rodzaju brakującej zasady.³⁸

Z punktu widzenia celu tej pracy, szczególnie istotne wydają się być sekwencje DNA mimikujące przerwę lub przerwy typu „nick” w nici, jako skutek działania topoiomerazy (*vide* rozdział 4). Oba modele hantli na rysunku 3.8 dobrze wpisują się w ten trend. Hantla dwucząsteczkowa, zawierająca dwie przerwy (NICK II), wydaje się być idealnym modelem sekwencji poddanej działaniu topoiomerazy II, a hantla jednocząsteczkowa, z jedną przerwą (NICK I) – sekwencji poddanej działaniu topoiomerazy I.

Dobrze zbadanym przykładem oligomeru typu NICK I jest modelowy dupleks z przerwą nicią opracowany w zespole prof. Kozerskiego, 5'-GCGTT↓GTCGC-3'. Przerwana nitka połączona jest z komplementarnym dekamerem, 3'-CGCAACAGCG-5', dwoma mostkami polietylenoglikolowymi (PEG₆) na końcach 3'- oraz 5'- przerwanej nici, tworząc cząsteczkę w postaci hantli (rysunek 3.9).⁴⁴



Rysunek 3.9. Model dekameru DNA, do badań inhibitorów topo I, z przerwą nicią (NICK I) w postaci hantli.⁴⁴

Mostki PEG₆ bardzo efektywnie stabilizują całą strukturę, a jednocześnie nie utrudniają obserwacji przesunięć chemicznych protonów deoksyrybozy (przesunięcia chemiczne PEG₆ występują w zakresie 3.1 – 4.0 ppm). Zarówno dyspersja przesunięć chemicznych protonów

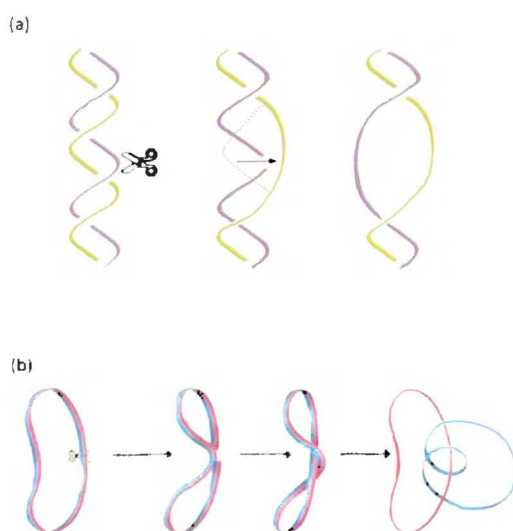
deoksyrybozy (27°C, bufor K_3PO_4), jak i analiza wycinalnych stałych sprzężenia wskazują, że sekwencja ta przyjmuje formę B-DNA, z odchyleniami, które mogą wynikać z obecności przerwy.

Przeanalizowano wpływ czynników wpływających na stabilność tego dupleksu. Dla tego rodzaju układów do tych czynników należą: pH, siła jonowa, stężenie i temperatura. Ponieważ łącznik polietylenoglikolowy przybiera formę zbliżoną do eteru koronowego, oczekiwano również wpływu rodzaju kationów na stabilność dupleksu. Jednak żaden ze stosowanych kationów (Na^+ , K^+ , Cs^+) nie tworzył kompleksu z łącznikiem. Wydaje się, że struktura linkera jest zbyt płaska i nie jest on czynnikiem chelatującym. Miarą stabilności struktury dupleksu w różnych roztworach była szerokość połówkowa sygnałów protonów metylowych pochodzących od tymidyn. Wzrost pH układu powodował zmniejszenie szerokości połówkowej sygnałów. Efekt ten nasilał się w przypadku stosowania buforu potasowego zamiast sodowego (o zbliżonej sile jonowej). Wynika to prawdopodobnie z mocniejszego oddziaływania K^+ w porównaniu z innymi kationami (jak wcześniej wspomniano, nie jest to spowodowane kompleksowaniem kationu przez PEG₆). Do wyznaczenia struktury dupleksu stosowano roztwory DNA o stężeniu 0.9 mM. Podwojenie stężenia nie wpłynęło na zmianę przesunięć chemicznych, lecz spowodowało pojawienie się osadu – wyciągnięto wniosek o ograniczonej (do *ca* 1.5 mM) rozpuszczalności dupleksu. Ogólnie, modelowy dupleks okazał się być stosunkowo stabilny, co odzwierciedla jego wysoka temperatura topnienia (80°C), porównywalna z 20-merem zawierającym mostki tymidynowe.³⁸

Wiele stosowanych dziś leków jest substancjami aktywnymi ze względu na oddziaływanie z DNA. Szczegółowe zrozumienie interakcji tych substancji z DNA powinno wyjaśnić sposób oddziaływania i wskazać kierunek rozwoju przyszłych leków. Do wyznaczenia struktury kompleksów DNA – lek stosowana jest zarówno krystalografia strukturalna, jak i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR). NMR pozwala poza tym uzyskać dodatkowe informacje dotyczące dynamiki dysocjacji takich kompleksów.⁴⁵ Do szczegółowych badań konformacyjnych wykorzystuje się krótkie dupleksy DNA o zdefiniowanej sekwencji, często składające się z komplementarnych nici. Takie fragmenty pozwalają otrzymywać widma NMR o dobrej rozdzielczości, umożliwiające wyznaczenie struktury. Do dziś zbadano wiele układów, w postaci typowych dupleksów, dupleksów ze zmodyfikowanymi zasadami bądź kompleksów z lekiem.

4. Topoizomerazy

Topoizomerazy są enzymami katalizującymi przemiany topoizomerów DNA w czasie replikacji. Mimo że topoizomeraza I została odkryta w latach 70-tych XX wieku (Wang, Gellert),^{46, 47} dopiero 10 lat później poznano jej znaczenie jako enzymu umożliwiającego replikację DNA. W normalnych warunkach DNA ma strukturę superhelikalną, natomiast w czasie replikacji rozwija się, a pojedyncza nić zachowuje się jak matryca do syntezy nowej nici. Topoizomeraza przyłącza się kowalencyjnie do cząsteczki DNA i rozcina ją, umożliwiając wzajemne przekształcenia topoizomerów. Topoizomerazy można podzielić na dwie główne rodziny: topoizomeraza I (topo I) i topoizomeraza II (topo II). Generalnie, topoizomerazy typu I odpowiadają za relaksację struktur superhelikalnych, natomiast topoizomerazy typu II wprowadzają ujemne superhelikalne skręty do cząsteczki. Mechanizmy tych przekształceń są różne. Proces relaksacji cząsteczki DNA (topo I) jest termodynamicznie korzystny, a proces odwrotny (topo II) wymaga obecności ATP.¹⁴ Topoizomeraza I przecina w cząsteczce tylko jedną nić, która obraca się wokół nierozciętego łańcucha (rysunek 4.1 a). Relaksacja DNA przez topoizomerazę II przebiega z wykorzystaniem energii z hydrolizy ATP i polega na przejściowym przecięciu obu nici DNA i przejściu przez przerwę innej podwójnej helisy. Wprowadza to do cząsteczki DNA dwa ujemne superhelikalne skręty (rysunek 4.1 b).



Rysunek 4.1. Schemat działania a) topoizomerazy I b) topoizomerazy II.⁴⁸

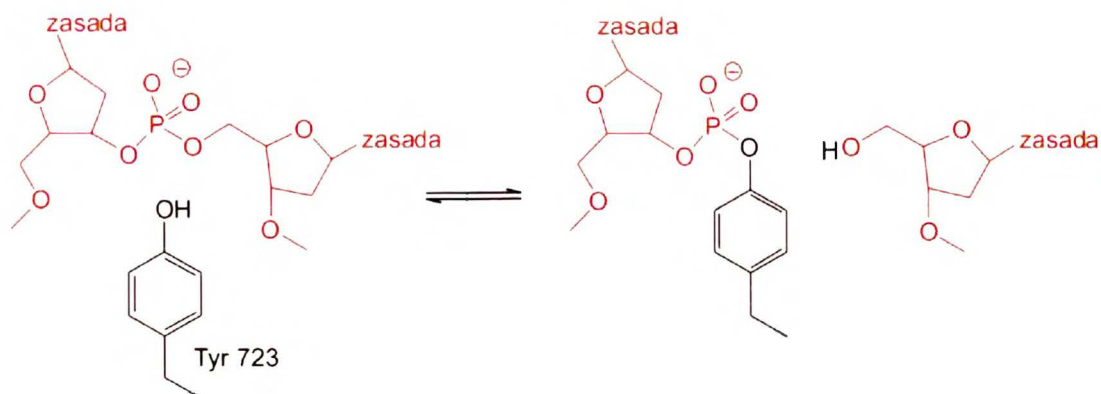
Odkrycie podwójnej helisy DNA pociągnęło za sobą natychmiastowe pytania dotyczące mechanizmu rozwijania splecionych ze sobą nici podczas replikacji. Jeśli macierzyste DNA ma ulegać replikacji poprzez rozdzielenie dwóch nici i skopiowanie każdej z nich, rozplatanie helisy w

zase replikacji musi przebiegać z dużą szybkością. Początkowo wysuwano przypuszczenia, że dwie nici DNA mogą być rozerwane dzięki rotacji dwuniciowej cząsteczki wokół swojej spiralnej osi. Przy szybkości replikacji 100 000 par zasad na minutę, prędkość tej rotacji wynosiłaby 10 000 obrotów na minutę (10 par zasad przypada na 1 skręt helisy). Ta prędkość, chociaż imponująca, nie wydaje się niemożliwa: dzięki smukłemu kształtowi podwójnej helisy, szacowany opór wynikający z lepkości jest raczej niewielki. Dwa odkrycia z lat 60-tych XX wieku zwiększyły zainteresowanie problemem rozplatania DNA. Po pierwsze, dowiedziono, że długość cząsteczek DNA pochodzących z naturalnych źródeł jest znacznie większa, niż wcześniej sądzono.⁴⁹ Szybko stało się jasne, że cały chromosom zawierający dziesiątki milionów par zasad jest jedną cząsteczką DNA o długości kilku milimetrów. Dla tak długiej cząsteczki, prostej idei rozplatania helisy poprzez rotację nitkowatej cząsteczki wzdłuż jej spiralnej osi nie daje się obronić. Po drugie, zaobserwowano cząsteczki DNA o kolistym kształcie.⁵⁰ Dla takiej, kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki, para nici nie może być rozdzielona bez przerwania przynajmniej jednej z nich. Ponieważ nawet liniowy chromosom wewnątrz komórki przybiera postać upakowaną, zawierającą wiele pętli, problem rozdziału nici nie różni się mocno od sytuacji kolistej cząsteczki DNA.⁵¹

Pierwszy enzym z rodziny topoizomeraz odkryto w bakterii *Escherichia coli* prawie 40 lat temu. Dzisiaj wiadomo, że wszystkie organizmy zawierają po kilka rodzajów topoizomeraz. Typ topo I można podzielić na dwie rodziny: IA (reprezentowaną przez bakteryjną topoizomerazę I i III oraz eukariotyczną topoizomerazę III) i IB (reprezentowaną przez eukariotyczną topoizomerazę I oraz topoizomerazę pokswirusową). Typ topo II można podzielić na dwie rodziny: IIA (do której należy między innymi bakteryjna topoizomeraza II [gyraza] i IV) i IIB (topoizomeraza VI archeowców).⁵² Związki z tej samej rodziny wykazują duże podobieństwo swoich sekwencji aminokwasów; podobna jest również charakterystyka ich reakcji.

Wszystkie topoizomerazy katalizują przejściowe rozcięcie DNA przez transestryfikację (mechanizm postulowany po raz pierwszy przez Wanga⁴⁶). Rozcięcie następuje poprzez nukleofilowy atak grupy hydroksylowej tyrozyny (Tyr 723) na wiązanie fosfodiesterowe DNA. Fenolowy atom tlenu reszty tyrozynowej ulega transestryfikacji z grupą fosforylową w nici DNA, rozrywając wiązanie fosfodiesterowe i tworząc wiązanie fosfotyrozynowe (schemat 4.1). Ponowne złączenie nici następuje w wyniku odwrotnej reakcji. Ponieważ kompleks DNA - enzym ulega znacznym zmianom konformacji pomiędzy rozcięciem i ponownym złączeniem nici, oba te etapy nie muszą być dokładnie odwrotne względem siebie. W przypadku topoizomerazy IB reszta tyrozynowa tworzy kowalencyjny związek przejściowy z DNA przez grupę 3'-fosforylową, natomiast dla pozostałych połączenie następuje przez grupę 5'-fosforylową. Topo I zachowują

się jak monomery; topo II są dimeryczne i para reszt tyrozynowych ulega transestryfikacji z parą grup fosforylowych w dwóch niciach dupletu DNA.



Schemat 4.1. Relaksacja DNA z udziałem Topo I. ¹⁴

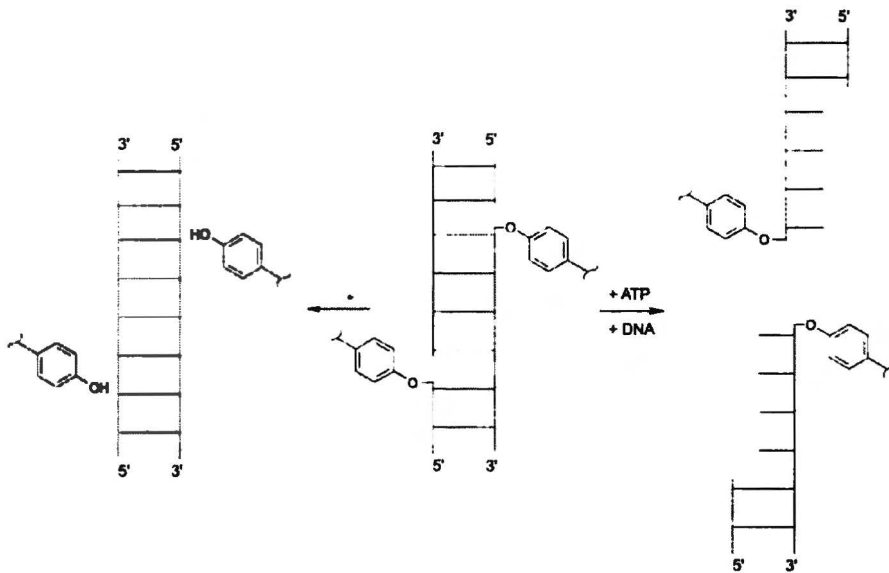
Utworzony związek przejściowy nosi nazwę kowalencyjnego kompleksu dwuskładnikowego (ang. *covalent binary complex*) (rysunek 4.2). W przypadku topo I relaksacja DNA następuje poprzez obrót nici rozciętej wokół nici nierozciętej. Następnie wolna grupa 5'-OH rozciętej nici atakuje fosfortyrozynowy kompleks aby odtworzyć wiązanie fosfodiesterowe w DNA i odłączyć DNA od enzymu (etap religacji). Takie odwracalne rozcięcie jednej nici DNA umożliwia rotację, dzięki której superhelikalne skręty usuwane są w sposób kontrolowany. ^{14, 51, 52}



Rysunek 4.2. Dwuskładnikowy kompleks DNA - topo I. ⁵³

Etap religacji jest z reguły znacznie szybszy niż etap rozszczepienia, więc stężenie kowalencyjnego kompleksu jest niskie. Topoizomeraza II działa poprzez rozcięcie i otwarcie dupletu DNA, przejście drugiego dupletu przez szczelinę i złączenie dupletu. Topo II generuje

zerwy w obu niciach, odległe o cztery pary zasad, tworząc podwójnie przerwany dupleks, wiązany kowalencyjnie z topo II dwiema 5'-fosfortyrozynami (schemat 4.2).⁵³



Schemat 4.2. Schemat rozrywania nici DNA przez Topo II.⁵⁴

Zakończenie procesu w przypadku Topo II wymaga obecności ATP (przyłączenie, a następnie hydroliza).

5. Klasyczne mechanizmy oddziaływania leków z DNA

Ze względu na silne upakowanie w komórce, DNA dostępne jest głównie dla niewielkich cząsteczek. Można wyróżnić trzy główne klasy związków oddziałujących z DNA:

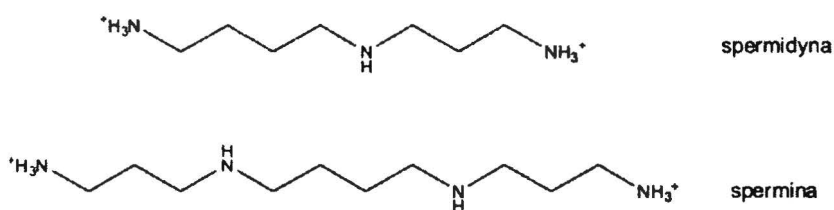
- 1) związki tworzące z DNA kompleksy niekowalencyjne, (ang. *reversible binders*). Do tej klasy związków zalicza się głównie interkalatory oraz związki oddziałujące w bruzdzie (ang. *groove binders*);
- 2) związki tworzące wiązania kowalencyjne z zasadami DNA, są to tzw. związki alkilujące DNA (alkilatory DNA, ang. *alkylators*);
- 3) związki powodujące pęknięcia nici DNA, są to tzw. leki przecinające nici DNA (ang. *strand breakers*).^{5, 55}

5.1. Związki tworzące kompleksy niekowalencyjne

Są trzy mechanizmy odwracalnego oddziaływania cząsteczek z DNA: poprzez oddziaływanie elektrostatyczne, interakcję z zasadami DNA zarówno w małej, jak i większej bruzdzie, oraz przez interkalację pomiędzy pary zasad.⁵

5.1.1. Oddziaływania elektrostatyczne

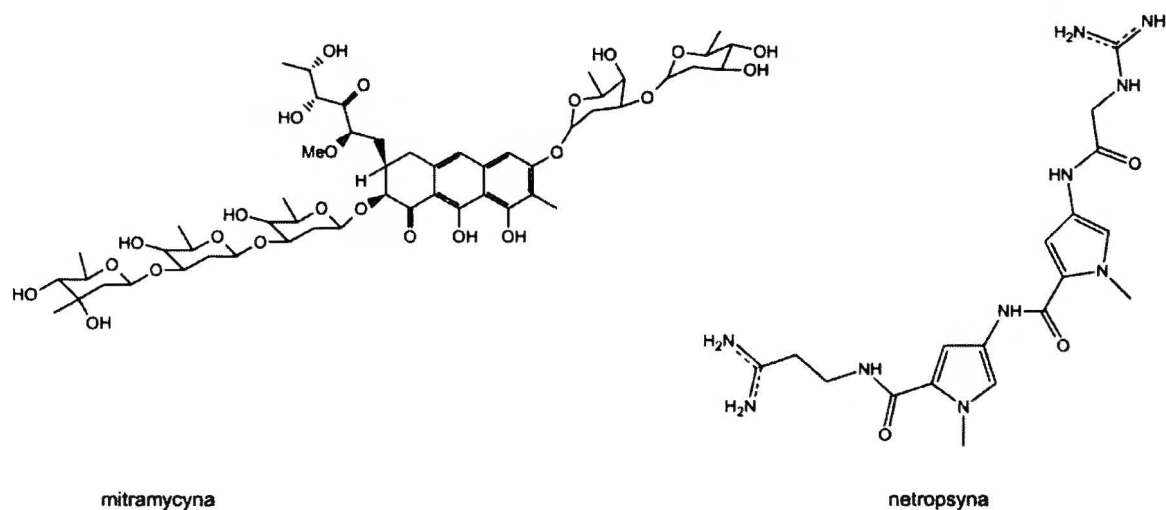
Oddziaływanie elektrostatyczne polega na przyciąganiu kationów przez ujemnie naładowany rdzeń cukrowo-fosforanowy DNA. Kationy i cząsteczki wody wiążą się z DNA i wpływają na trwałość struktur drugorzędowych. Uwolnienie przeciwjonów ma zarówno korzystny (wzrost entropii), jak i niekorzystny (obniżenie entalpii) wpływ na energię swobodną. Ten typ oddziaływań nie zależy od sekwencji DNA.⁵ Związki oddziałujące elektrostatycznie mają duży wpływ na konformację i stabilność DNA, jednak przeważnie nie mają one znaczenia klinicznego. Istnieje wiele typów cząsteczek oddziałujących elektrostatycznie z DNA. Najbardziej klasycznymi są poliaminy, szczególnie spermina i spermidyna (rysunek 5.1). Niespecyficzna natura oddziaływań powoduje, że trudno jest uzyskać widma NMR wysokiej rozdzielczości lub struktury rentgenograficzne takich kompleksów. Takie poliaminy są wszechobecne w komórkach eukariotycznych i dlatego podejrzewa się, że odgrywają istotną rolę w wielu procesach komórkowych. Jednym z nich jest upakowanie DNA w chromatynę.¹⁵



Rysunek 5.1. Przykłady związków oddziałujących elektrostatycznie z DNA.

5.1.2. Oddziaływania w dużej i małej bruzdzie

Mniejsza i większa bruzda DNA znacząco różnią się potencjałem elektrostatycznym, zdolnością tworzenia wiązań wodorowych, efektem sterycznym oraz stopniem hydratacji. W większej bruzdzie mogą oddziaływać nawet cząsteczki białek, natomiast w mniejszej – głównie cząsteczki o masie poniżej 1000 Da.⁵⁶ Charakteryzują się one najczęściej obecnością kilku prostych pierścieni aromatycznych (pirolowych, furanowych, benzenowych, imidazolowych) połączonych wiązaniami pojedynczymi, co umożliwia rotację pozwalającą na dopasowanie do kształtu bruzdy.



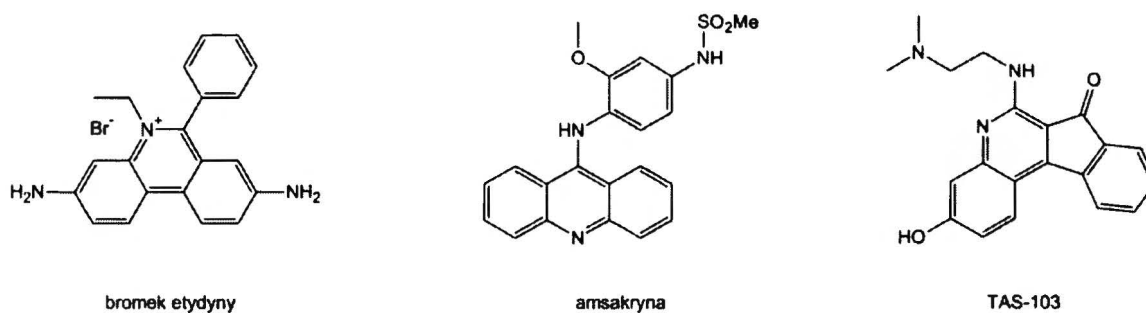
Rysunek 5.2. Przykłady związków oddziałujących w bruzdzie DNA.

Związki te (ang. *groove binders*) oddziałują specyficznie z określonymi sekwencjami, np. netropsyna z regionami bogatymi w pary AT, a mitramycyna z regionami bogatymi w pary GC (rysunek 5.2).⁵⁷ Inne przykłady tych związków to distamycyna A, berenil, Hoechst 33258, DAPI.

⁵⁷, 58, 15

5.1.3. Interkalacja pomiędzy pary zasad

Interkalacja jest niekowalencyjnym oddziaływaniem, w którym lek wsuwa się pomiędzy pary zasad DNA, prostopadle do osi helisy. Nie narusza to par Watsona – Cricka, ale powoduje odsunięcie się od siebie par zasad i zaburzenie struktury rdzenia cukrowo-fosforanowego.⁵ Najłatwiej interkalują płaskie cząsteczki aromatyczne, zbudowane z co najmniej dwóch pierścieni sześciocłonowych, które tworzą „platformę” o rozmiarach porównywalnych z parą zasad DNA.¹⁵ Interkalacja częściej ma miejsce w sekwencji 3'-pirymidyny i 5'-puryny niż 3'-puryny i 5'-pirymidyny. Obecnie uważa się, że interkalacja jest jedynie pierwszym stadium prowadzącym do uszkodzenia DNA. Mechanizm interkalacji składa się z dwóch etapów. W pierwszym, interkalator w formie kationu tworzy kompleks z ujemnie naładowanym łańcuchem cukrowo-fosforanowym. Następnie interkalator dyfunduje wzdłuż helisy aż natrafi na odpowiadającą przerwę pomiędzy parami zasad. Wiele związków przeciwnowotworowych po interkalacji oddziałuje z topoisomerezą DNA i często są one klasyfikowane jako inhibitory topoisomerazy.⁵ Przykłady interkalatorów DNA to: bromek etydyny, amsakryna, proflawina, TAS-103 (rysunek 5.3), a także kwas nalidyksynowy, adriamycyna (doksorubicyna), mitoksantron, triostyna.^{5, 15, 59}



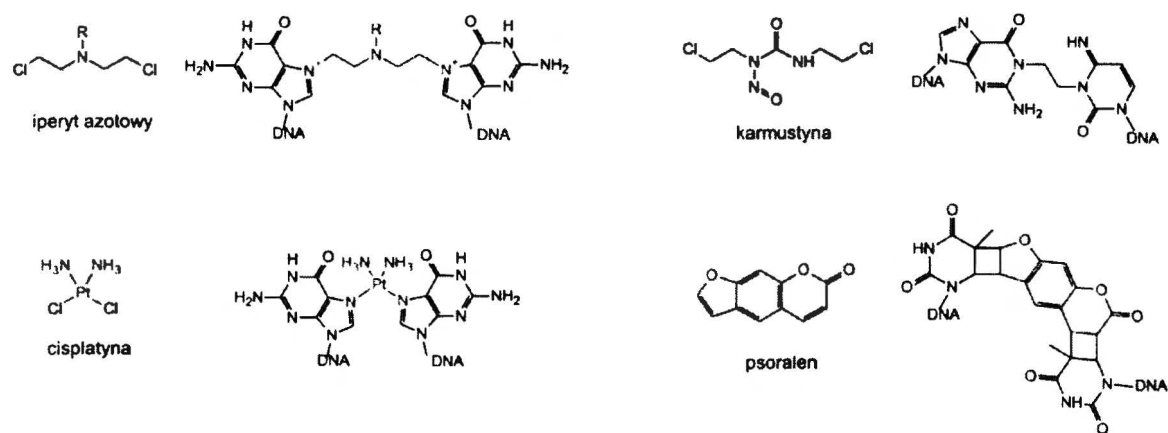
Rysunek 5.3. Przykłady interkalatorów DNA.

Bisinterkalatory są dwufunkcyjnymi cząsteczkami, zawierającymi dwa interkalujące układy planarne połączone łańcuchem o różnej długości. Projektuje się również związki zbudowane z trzech i więcej układów. Takie cząsteczki mają zwiększone powinowactwo w porównaniu ze zwykłymi interkalatorami, co powinno wpływać na poprawę właściwości terapeutycznych. Do bisinterkalatorów należy np. bisakrydyna, bisdaunomycyna.¹⁵

5.2. Związki alkilujące

Różnica między alkilatorami i interkalatorami DNA polega na rodzaju oddziaływań: interkalatory oddziałują w sposób niekowalencyjny, a związki alkilujące reagują z DNA z utworzeniem wiązań kowalencyjnych. Alkilowanie następuje w wyniku reakcji S_N1 lub S_N2 . Reaktywność miejsc nukleofilowych w DNA jest następująca: atomy N-7 guaniny > N-3 adeniny > N-7 adeniny > N-3 guaniny > N-1 adeniny > N-1 cytozyny. Możliwe jest również alkilowanie atomów N-3 cytozyny i O-6 guaniny, a także grup fosforanowych. Kolejność ta wynika z warunków sterycznych, elektronowych i wpływu wiązań wodorowych (niektóre miejsca nukleofilowe we wnętrzu helisy są niedostępne). Przykładami alkilatorów DNA są: iperyty azotowe (np. melfalan), nitrozomoczniki (np. karmustyna) (rysunek 5.4), a także trietylenomelamina, busulfan, duokarmycyna, mitomycyna.⁵

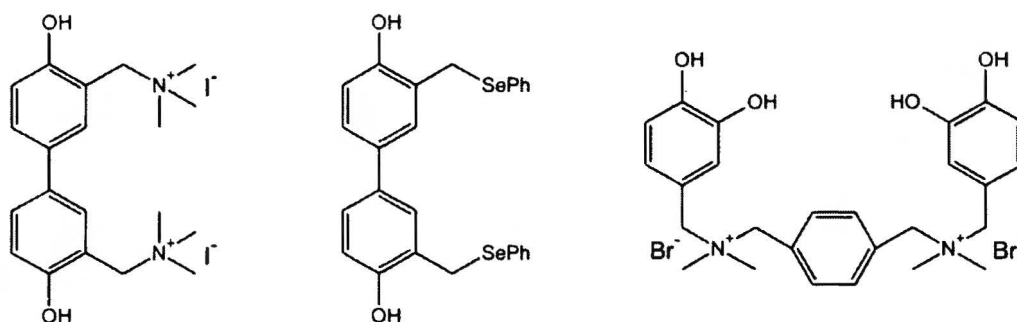
Lekami powiązаныmi z alkilatorami są kompleksy metali. Podobieństwo polega na tworzeniu w reakcjach podstawienia wiązań nieodwracalnych. Najważniejszym lekiem z tej grupy jest cisplatyna (rysunek 5.4), która została zarejestrowana przez US FDA w 1978 roku i zrewolucjonizowała leczenie chorób nowotworowych. Cisplatyna wiąże się do atomu N-7 guaniny, a następnie do atomu N-7 kolejnej puryny, działa więc jak bisinterkalator. Cisplatyna działa selektywnie na sekwencje d(pGpG) i d(pApG), ale nie na d(pGpA). Wiąże się również z dwiema guaninami rozdzielonymi jedną zasadą, jak w sekwencji d(pGpG). Inne związki z tej grupy to karboplatyna, oksaliplatyna, diocetanodichloroplatyna.¹⁵



Rysunek 5.4. Iperyty azotowy, karmustyna, cisplatyna i psoralen oraz tworzone przez nie międzyniciowe wiązania krzyżowe z DNA.⁶⁰

Dwufunkcyjne środki alkilujące (bisalkilatory) tworzą wiązania krzyżowe. Mogą to być zarówno wiązania w obrębie jednej nici, jak i międzyniciowe (ang. *interstrand crosslinks*, ICL). Te

statnie stanowią przeważnie jedynie 1 – 5 % wszystkich adduktów (oprócz cisplatyny), ale mają użo większe znaczenie cytotoksyczne. Związki mające zdolność tworzenia ICL nazywane są czynnikami krzyżującymi/sieciującymi (ang. *cross-linking agents*) i zalicza się do nich między innymi iperyty azotowe, karmustynę, cisplatynę, psoralen (rysunek 5.4).⁶¹ Busulfan, który również jest reagentem dwufunkcyjnym, tworzy wiązania w obrębie tylko jednej nici. Karmustyna i pozostałe nitrozomoczniki są tzw. czynnikami aktywowanymi metabolicznie, tzn. dopiero w obecności enzymów stają się czynnikami alkilującymi. Psoralen z kolei staje się czynnikiem krzyżującym/sieciującym dopiero po naświetleniu w dalekim nadfiolecie.⁶⁰ W ostatnich latach pojawiło się sporo doniesień o związkach sieciujących zawierających fragmenty fenolowe (rysunek 5.5).^{62, 63, 64}

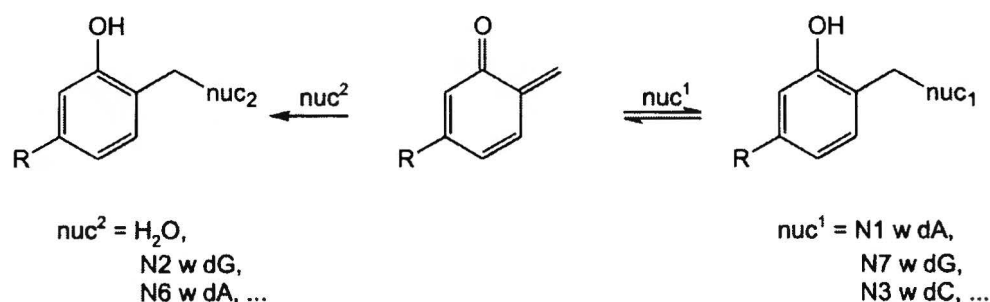


Rysunek 5.5. Przykłady związków krzyżujących zawierających fragment fenolowy.^{62, 63, 64}

Mechanizm działania takich związków polega na utworzeniu metydu *o*-chinonu (ang. *o-quinone methide*, QM), związku przejściowego, który jest dobrym akceptorem Michaela i reaguje z grupami nukleofilowymi zasad DNA (schemat 5.1). Zaletą tej grupy związków jest dobra rozpuszczalność w wodzie i wysoka aktywność. Powstawanie reaktywnych związków przejściowych QM jest powodowane przez utlenianie lub naświetlanie światłem UV. Powstały związek przejściowy reaguje z silnym nukleofilem w DNA, a proces ten jest kontrolowany kinetycznie. Reakcja jest odwracalna i ostatecznie, w procesie kontrolowanym termodynamicznie, powstaje addukt ze słabszym nukleofilem (schemat 5.1). Dzięki temu efektywny czas życia związku przejściowego QM jest wydłużony z milisekund do godzin, a nawet dni.⁶⁵

Wydajność tworzenia wiązań krzyżowych jest związana z odwracalnością zachodzących reakcji. Jeśli reakcje biegną w sposób nieodwracalny, alkilowanie DNA przez pierwszą grupę bisinterkalatora na stałe „kotwicz” związek w miejscu, w którym alkilowanie przez drugą grupę bisinterkalatora może nie być możliwe. W przypadku związków działających w sposób

odwracalny, aktywny związek przejściowy może ulegać odtworzeniu i następnej reakcji w innym miejscu, prowadzącej do wiązania krzyżowego. Związki przejściowe QM mogą reagować właśnie w taki sposób i stąd wynika ich efektywność w reakcji z DNA. Dla związków tych, stosunek tworzonych wiązań krzyżowych do monoalkilowania jest większy, niż dla klasycznych bisinterkalatorów.⁶⁵

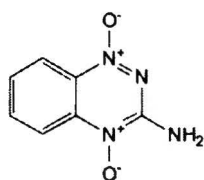


Schemat 5.1. Odwracalność reakcji krzyżowych przebiegających przez związek pośredni typu QM.⁶⁵

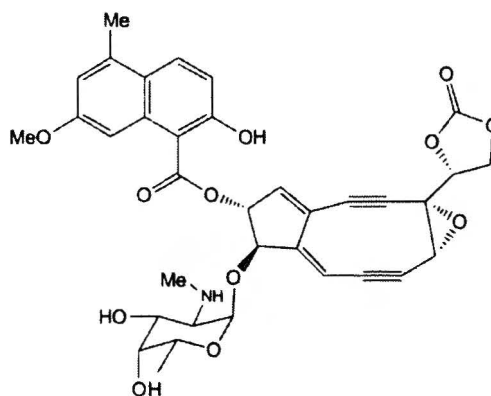
Mimo że nie ma bezpośredniej korelacji między reaktywnością czynnika alkilującego a skutecznością terapeutyczną, wielofunkcyjne związki alkilujące są bardziej efektywne od cząsteczek jednofunkcyjnych.⁵

5.3. Związki przecinające nici DNA

Niektóre związki mogą interkalować DNA, a następnie w określonych warunkach generować rodniki. Rodniki mogą z kolei odrywać protony z łańcuchów cukrowo-fosforanowych lub zasad DNA, co prowadzi do przerwania nici. Leki tego rodzaju są więc źródłami aktywowanych metabolicznie rodników. Przykłady takich związków to: neokarcynostatyna (zinostatyna), tirapazamina (rysunek 5.6) oraz bleomycyna czy antracykliny.⁵



tirapazamina



neokarcynostatyna

Rysunek 5.6. Przykłady związków przecinających nici DNA.

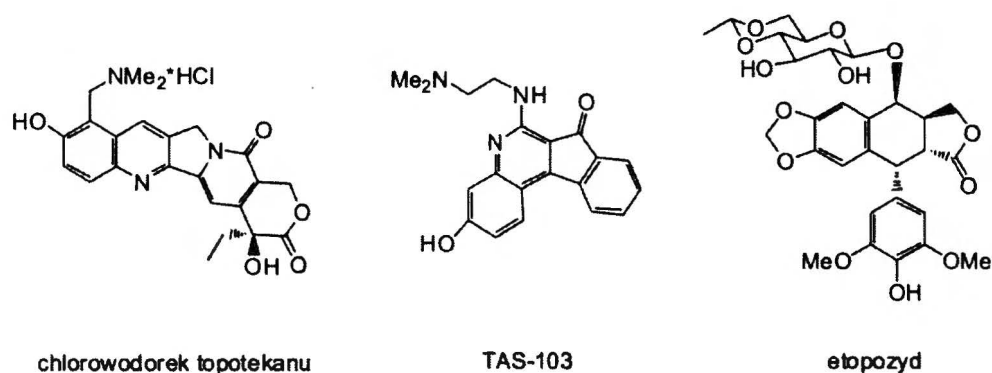
Powyzsza klasyfikacja jest podziałem dokonany w oparciu o mechanizm oddziaływania z DNA. Obecnie uważa się, że oddziaływania te mogą być jedynie pierwszym etapem w procesie, który ostatecznie prowadzi do uszkodzenia DNA poprzez inny mechanizm, np. inhibicję topoiizomerazy.

6. Inhibitory topoizomerazy I i II

Większość leków z tej grupy według klasycznego podziału zaliczana jest do grupy interkalatorów DNA. Dla wielu klas leków przeciwnowotworowych, interkalacja jest jednym z etapów w procesie oddziaływania z topoizomerazą DNA. Przykładowo, kompleks DNA - topo I jest celem dla chlorowodoru topotekanu (Hycamtin, rysunek 6.1), a DNA - topo II dla takich klas związków jak antracykliny, antracenodiony, akrydyny, aktynomycyny czy elipticyny. Dotychczasowe wyniki sugerują, że inhibitory DNA powodują stabilizację rozszczepialnego kompleksu dwuskładnikowego DNA – topo, (ang. *cleavable binary complex*) powstającego w czasie relaksacji, poprzez utworzenie nierozszczepialnego kompleksu trójskładnikowego złożonego z DNA, topo i leku. Przypuszcza się, że taki kompleks może zderzać się z kompleksami transkrypcyjnymi i replikacyjnymi; przy zderzeniu trójskładnikowy kompleks może tracić zdolność odwracalności, co generuje śmiertelne pęknięcia w nici DNA. Nie jest jasne, czy pierwszym etapem jest interkalacja leku do DNA, a następnie utworzenie kompleksu trójskładnikowego z topo, czy też lek atakuje utworzony wcześniej kompleks DNA – topo.⁵ Przykładem jest TAS-103 (rysunek 6.1), lek przeciwnowotworowy, który najpierw interkaluje DNA, a następnie prowadzi do śmierci komórki poprzez zwiększenie ilości pękniętej nici DNA. Badania serii antracyklin wskazują, że interkalacja DNA przez te związki jest warunkiem koniecznym, lecz niewystarczającym dla aktywności wobec topoizomeraz. Występuje wprawdzie silna korelacja pomiędzy zdolnością do interkalacji a możliwością tworzenia nierozszczepialnego kompleksu, nie ma jednakże zależności pomiędzy interkalacją DNA a aktywnością przeciwnowotworową. Interkalacja może nie być bezpośrednią przyczyną uszkodzenia DNA, ale powoduje ona zmianę konformacji podwójnej helisy. To z kolei może skutkować umieszczeniem leku w DNA w sposób umożliwiający wiązanie z topoizomerazą.⁵ Niektóre silne interkalatory nie tworzą kompleksów trójskładnikowych, prawdopodobnie dlatego, że nie spełniają wymagań strukturalnych, umożliwiających oddziaływanie z topoizomerazą. Zdarzają się również inhibitory topoizomeraz, które nie są interkalatorami np. etopozyd (Etopophos, rysunek 6.1), inhibitor topo II.⁵ Niektórzy autorzy postulują podział związków wpływających na aktywność topoizomeraz na dwie kategorie: inhibitory (ang. *inhibitors*) i trucizny (ang. *poisons*). Pierwsze miałyby obniżać ogólną aktywność enzymu, a drugie zwiększać ilość kompleksu DNA – topo.⁶⁶ Podział ten wydaje się jednak sztuczny, ze względu na powszechne wymienne stosowanie obu terminów w większości prac.

Mimo że mechanizm działania inhibitorów topoizomeraz nie jest dostatecznie wyjaśniony, trójskładnikowy kompleks wydaje się wywoływać apoptozę namnażających się komórek.⁶⁷ Selektywna wrażliwość komórek nowotworowych na cytotoksyczny efekt inhibitorów

topoizomeraż może wynikać z obecności dużej ilości topoizomerazy w komórkach mnożących się w porównaniu z jej bardzo niewielką ilością w komórkach w fazie spoczynku (G_0).

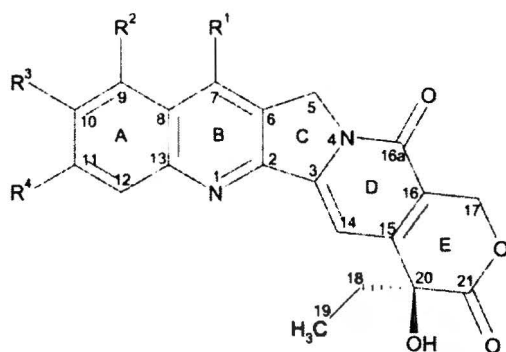


Rysunek 6.1. Przykłady interkalatorów DNA.

6.1. Inhibitory topoizomerazy I

6.1.1. Kamptotecyna

Wśród inhibitorów topo I kamptotecyny stanowią najszerzej badaną grupę związków. Kamptotecyna (CPT) została po raz pierwszy wyizolowana z chińskiego drzewa dekoracyjnego *Camptotheca Acuminata* Decne (Xi Shu, Happy Tree). Występuje ona zarówno w korzeniach, gałęziach, jak i liściach rośliny. Odkrycie w latach 60-tych XX wieku (Wall i Wani) właściwości chemoterapeutycznych kamptotecyny wskazało nowy kierunek w leczeniu nowotworów.⁶⁸ Wstępne badania wskazywały na antynowotworową aktywność CPT w standardowych testach *in vitro* oraz wobec komórek białaczki u myszy. Kamptotecyna była testowana klinicznie w postaci rozpuszczalnego w wodzie karboksylanu sodu. Na początku lat 70-tych XX wieku badania zostały jednak przerwane, z powodu dyskwalifikujących efektów ubocznych, takich jak krwotoczne zapalenie pęcherza czy ciężka mielosupresja (zahamowanie czynności szpiku kostnego).⁶⁹ Zainteresowanie kamptotecyną i jej analogami pozostawało niewielkie aż do roku 1985, kiedy odkryto, że CPT poprzez unikalny mechanizm, inhibuje enzym DNA - topoizomerazę I (topo I).⁷⁰ Było to początkiem rozwoju leków przeciwnowotworowych, których celem jest kowalencyjny kompleks DNA – topo I.



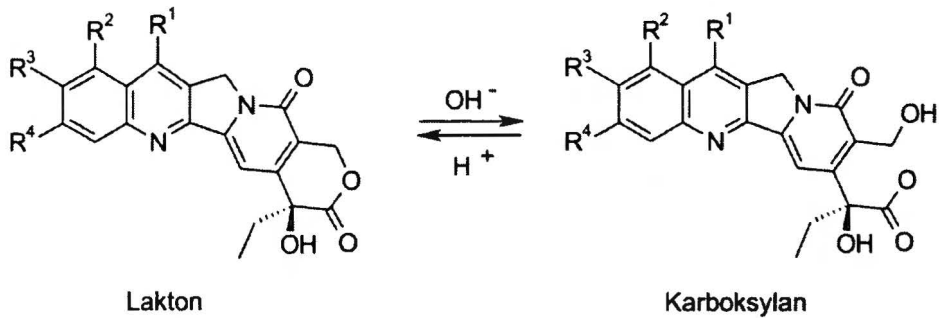
związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
kamptoteczyna	H	H	H	H
irinotekan	-CH ₂ CH ₃	H		H
topotekan	H	-CH ₂ N(CH ₃) ₂	OH	H
exatekan	-CH-CH ₂ CH ₂ - NH ₂		CH ₃	F
gimatekan	-CH=NOC(CH ₃) ₃	H	H	H
kareniteczyna	H	CH ₂ CH ₂ Si(CH ₃) ₃	H	H
lurtotekan		H	-OCH ₂ CH ₂ O-	
rubitekan	H	NO ₂	H	H

Tabela 6.1. Struktura związków z rodziny kamptoteczyn.⁷¹

Kamptoteczyna i jej analogi posiadają pięciocykliczny rdzeń, który można podzielić na trzy części: (i) fragment chinolinowy (pierścienie A i B), który może być podstawiony różnymi grupami funkcyjnymi bez straty aktywności; (ii) fragment indolizynowy (pierścienie C i D), zawierający grupę karboksylową, niezbędną do aktywności bilologicznej wobec topo I, oraz (iii) pierścień α -hydroksylaktonowy (E) z ulokowanym w nim centrum asymetrii o konfiguracji *S*, który również jest aktywnym centrum w cząsteczce CPT (tabela 6.1).⁶⁹

Pierścień E jest labilnym elementem cząsteczki kamptoteczyny. Lakton jest niezbędny do inhibicji topo I, ale zaktywowany przez grupę hydroksylową na chiralnym atomie węgla jest bardzo podatny na hydrolizę w warunkach fizjologicznych (pH \geq 7) (schemat 6.1). W roztworze,

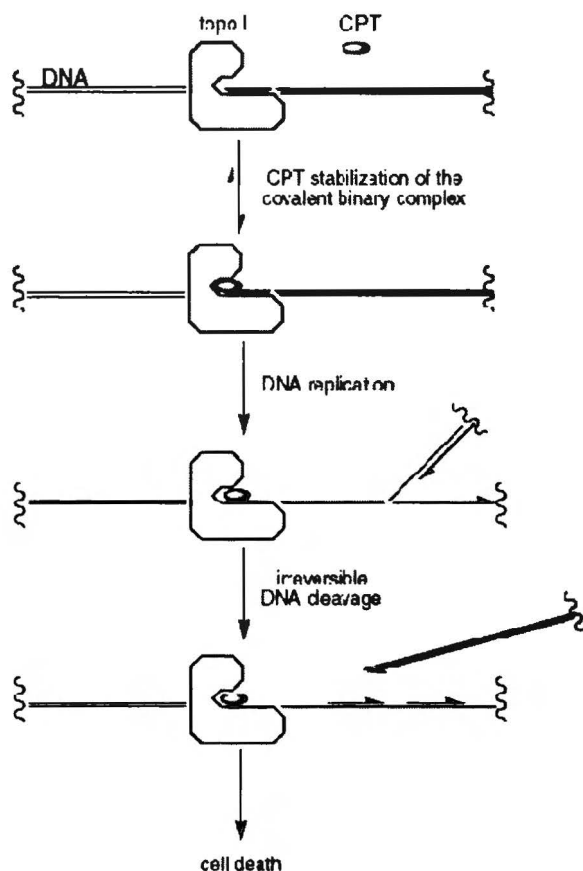
kamptotecyny występują w równowadze pomiędzy zamkniętą formą laktonową i otwartą karboksylanową, która jest biologicznie nieaktywna. pH roztworu oraz obecność topo I i odpowiedniej sekwencji DNA mogą przesuwac tę równowagę i regulować aktywność biologiczną.^{72, 73}



Schemat 6.1. Równowaga karboksylan – lakton związków z grupy CPT.

Związki z grupy kamptotecyn mają wiele ograniczeń jako leki. Po pierwsze, kowalencyjne kompleksy topo – DNA muszą być utrzymane dostatecznie długo, by doszło do uszkodzenia DNA. CPT szybko dyfundują z takich kompleksów, co oznacza, że muszą być podawane w formie przedłużonej infuzji. Po drugie, kamptotecyny prowadzą do wielu efektów ubocznych, co ogranicza ich dopuszczalne dawki. Po trzecie, pierścień α -hydroksylaktonowy (E) jest podatny na hydrolizę do karboksylanu, który jest nieaktywny wobec topo I. Do końca XX wieku otrzymano wiele analogów kamptotecyny, a dwa z nich: topotekan (Hycamtin, w 1994 roku) i irinotekan (Camptosar, 1996) przeszły wszystkie etapy badań klinicznych i zostały zatwierdzone w leczeniu nowotworów, między innymi jajnika i jelita grubego. Wiele innych analogów jest obecnie w fazie badań klinicznych.^{74, 75, 76, 77, 78, 79, 80}

Doniesienia, że CPT stabilizuje dwuskładnikowy kompleks DNA – topo I pojawiły się w 1985 roku. Już wcześniej było jednak wiadomo, że CPT może inhibować syntezę DNA, co z kolei powoduje apoptozę komórki w fazie S cyklu komórkowego (w której następuje replikacja DNA).⁷⁹ Specyficzna toksyczność w fazie S jest bezpośrednio związana z występowaniem nieodwracalnego uszkodzenia DNA podczas replikacji (powstawanie kowalencyjnego kompleksu DNA – enzym) (schemat 6.2). Usunięcie genu dla topo I z *Saccharomyces cerevisiae* skutkuje całkowitą odpornością komórek na CPT.⁸⁰ Otrzymano również wiele linii komórkowych odpornych na CPT, każda z nich zawierała mutację reszt topo I.⁸¹ Te badania jednoznacznie potwierdzają mechanizm działania kamptotecyny obejmujący wprowadzone przez topo I pęknięcie DNA.

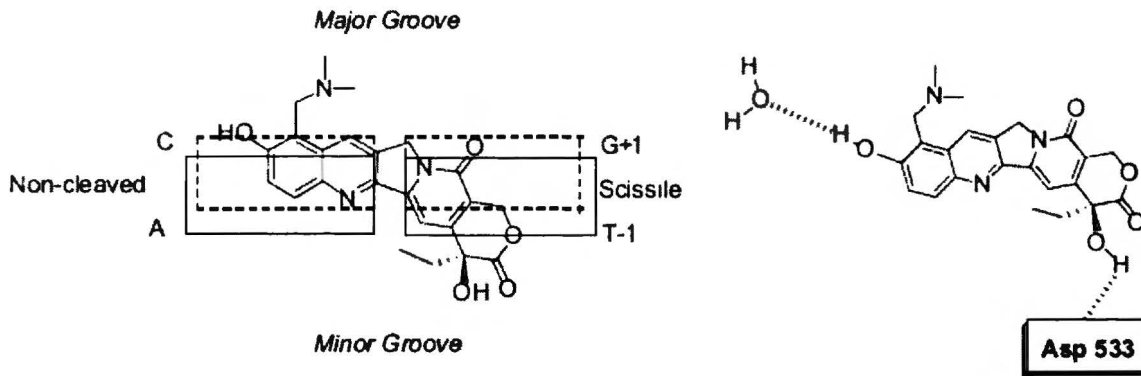


Schemat 6.2. Cytotoksyczny mechanizm działania kamptotecyn.⁸²

Topo I może uszkadzać DNA w wielu miejscach, jednak wykazuje silną preferencję do tymidyny. Do stabilizacji kompleksu kowalencyjnego przez CPT dodatkową preferencję stanowi obecność guanozyny w pozycji +1. Precyzyjne poznanie sposobu stabilizacji kompleksu DNA – topo I przez kamptotecyny (a co za tym idzie, inhibicję religacji dupleksu DNA) jest obecnie ważnym zadaniem. Kamptotecyna nie wykazuje powinowactwa do topo I, natomiast dodatnio naładowany analog, topotekan, wiąże się z DNA.^{74, 75, 83} Jednak zdolność CPT do wiązania się z podwójnym kompleksem DNA – topo I jest wystarczająca do inhibicji religacji. Dowiedziono, że kamptotecyna może oddziaływać z kompleksem dwuskładnikowym w punkcie styczności DNA i topo I, lub w jego pobliżu. Hertzberg i inni ustalili, że pochodna CPT zawierająca bromoacetamid w pozycji C-10 jest zdolna do tworzenia połączeń lek – enzym.⁸⁴ Pommier i inni wykazali później, że 7-chlorometylowany analog kamptotecyny alkiluje atom N3 guanozyny w pozycji +1 przerwanej nici DNA.⁸⁵

Zdefiniowano kilka modeli teoretycznych obrazujących oddziaływania pomiędzy CPT a kompleksem dwuskładnikowym.^{86, 87, 88} Modele te postulują różne oddziaływania pomiędzy CPT,

parą zasad DNA -1/+1 przy przerwie oraz wybranymi resztami aminokwasowymi topo I. Analiza kilku linii komórkowych odpornych na CPT dostarczyła informacji dotyczących reszt aminokwasowych, które odgrywają rolę w oddziaływaniu kompleksu dwuskładnikowego z CPT (przykładowo, Asp533, Arg364, Asn722, Lys532).^{89, 90, 91}



Rysunek 6.2. Przedstawienie struktury rentgenograficznej topotekanu w kompleksie dwuskładnikowym.⁸

Początkowo sądzono, że leki z grupy kamptotecyn interkalują nieuszkodzoną helisę, lecz obecnie uważa się, że oddziałują z nią w inny sposób.^{92, 93} Różnice przesunięć chemicznych na widmach ³¹P NMR kompleksu DNA – CPT są pomijalne, co wskazuje brak deformacji rdzenia fosfodiesterowego DNA (dla cząsteczek interkalujących różnice przesunięć chemicznych wynoszą ok. 1 – 1.5 ppm w stronę niższych częstości). Występujące oddziaływanie (o którym świadczą sygnały korelacyjne pochodzące od protonów CPT i podwójnej helisy na widmach NOESY) zdefiniowano jako „stacking” z terminalnymi zasadami.⁹² Badania oddziaływań DNA z pochodną CPT, topotekanem, metodami optycznymi (spektroskopia UV-Vis, dichroizm liniowy) i obliczeniowymi wskazują, że topotekan wbudowuje się w mniejszą bruzdę.⁹³ Wykazuje też większe powinowactwo do par zasad GC, szczególnie terminalnych.^{83, 94} W przypadku oddziaływania z przerwany DNA ("nick"), topotekan interkaluje w przerwę w nici.^{9, 53} Dowodzą tego struktury rentgenograficzne trójskładnikowego kompleksu utworzonego pomiędzy DNA, topo I i topotekanem.⁵³ Badany kompleks składał się z oligonukleotydu zawierającego łącznie 5-fosfotioestrowy ułatwiający krystalizację i wskazywał, że topotekan zachowuje się jak interkalator (rysunek 6.2). Jedyne bezpośrednie wiązanie wodorowe pomiędzy lekiem a enzymem występowało pomiędzy Asp533 a grupą 20-hydroksylową topotekanu. Dodatkowo, obserwowano jedno wiązanie wodorowe z cząsteczką wody. Atomy węgla C-7, C-9 i C-10 topotekanu znajdowały się w sąsiedztwie większej bruzdy.

Precyzyjne zrozumienie mechanizmu inhibicji religacji DNA przez kamptotecyny i wgląd w rolę poszczególnych elementów strukturalnych są kluczowe do stworzenia nowych, terapeutycznie ważnych pochodnych. Obecnie dobrze znany jest profil SAR (ang. *structure – activity relationship*) CPT (*vide infra*).

Modyfikacje aromatycznego rdzenia kamptotecyny są przeważnie ograniczane do układu chinolinowego (pierścienie A/B). Przyjmuje się, że planarność układu złożonego z czterech pierścieni aromatycznych jest koniecznym warunkiem inhibicji topoizomerazy I, czego dowodem były badania pochodnych modyfikowanych zarówno w obrębie układu chinolinowego, jak i pierścieni C/D.^{95, 96, 97} Modyfikacje w pierścieniach C/D są ograniczone ilością dostępnych atomów węgla (tylko C-5 i C-14), a analogi z podstawnikami w tych pozycjach wykazują zmniejszoną aktywność. Wyjątek dotyczy pochodnych CPT zawierających w pozycji C-5 podstawnik $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{F}$ lub $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_4\text{H}_8)$, które charakteryzowały się aktywnością *in vitro* i *in vivo*.^{98, 99}

Większość badań dotyczących modyfikacji kamptotecyny koncentrowała się na transformacji układu chinolinowego. Wall, Wani i inni przebadali szereg pochodnych CPT, co pozwoliło zidentyfikować niektóre zależności pomiędzy strukturą a aktywnością.^{100, 101, 102, 103} Podstawniki w pozycjach C-11 i C-12 są zasadniczo niekorzystne, chociaż istnieją pewne wyjątki. Podstawniki w pozycjach C-7, C-9 i C-10 nie powodują znaczącego spadku aktywności. Badania Kingsbury'ego potwierdziły te obserwacje.¹⁰⁴ Były to pierwsze doniesienia na temat znaczenia klinicznego pochodnych: 9-aminokamptotecyny, 9-nitrokamptotecyny (rubitekanu) i topotekanu.

Modyfikacje pierścienia laktonowego E nie prowadzą do powstania ważnych pochodnych CPT. Zmiany grup funkcyjnych pierścienia E: laktonu i grupy 20(S)-hydroksylowej mają duży wpływ na spadek aktywności. Enancjomer 20(R), dostępny metodami syntetycznymi, jest nieaktywny jako inhibitor topo I. Aktywność enancjomeru 20(S) wynika prawdopodobnie ze specyficznego oddziaływaniem grupy 20-hydroksylowej z kompleksem dwuskładnikowym DNA – topo I. Zamiana grupy 20-hydroksylowej na grupę aminową wpływa na znaczne obniżenie aktywności, natomiast pochodne 20-chlorowcowe zachowują ją w znacznym stopniu.¹⁰⁵ Związek 20-deoksy nie wykazuje cytotoksyczności.¹⁰⁶ Duża różnica aktywności pochodnych z różnymi podstawnikami w pozycji C-20 może dotyczyć ich zdolności tworzenia wiązania wodorowego. Prawdopodobnie grupa 20(S)-hydroksylowa jest raczej specyficznym akceptorem, niż donorem. Możliwe jest także, że podstawnik w tej pozycji jest niezbędny do zachowania konformacji pierścienia E sprzyjającej stabilizacji kompleksu trójskładnikowego.⁸²

Pierścień laktonowy jest również ważny dla zachowania cytotoksyczności. Widoczny brak aktywności karboksylanowej formy CPT doprowadził badaczy do rozważenia bardziej hydrolytycznie stabilnych układów. Przykładem jest pochodna laktamowa, o zwiększonej stabilności w układach wodnych, która jednak jest nieefektywna jako inhibitor topo I.¹⁰⁶ Także inne analogi (tiolakon, pochodne imidowe, laktolowe etc.) były w większości nieaktywne.^{106, 107} Znane są prace, w których otrzymywano aktywne pochodne zawierające pięcio- lub siedmiocłonowy pierścień laktonowy.^{108, 109} Zastąpienie pierścienia α -hydroksylaktonowego β -hydroksylaktonem zaowocowało klasą analogów CPT, tak zwanych homo-kamptotecyn, o zwiększonej stabilności w osoczu i dobrej aktywności.¹¹⁰ Pomimo oczywistej wagi pierścienia laktonowego do zachowania zdolności inhibicji topo I, znany jest naturalnie występujący alkaloid – luotonina A, również będący inhibitorem topo I. Związek ten ma identyczne jak w CPT pierścienie A-C, różni się natomiast znacznie w pierścieniu E, który jest niepodstawionym benzenem.¹¹¹

Sukces kliniczny topotekanu i irinotekanu przyspieszył prace nad rozpuszczalnymi w wodzie pochodnymi kamptotecyny. Znanych jest wiele przykładów badań takich pochodnych: zarówno ich aktywności biologicznej, jak i stabilności pierścienia laktonowego.¹¹² Wśród najbardziej aktywnych analogów jest lurtotekan, tj. 10, 11-(metylenodioxo)-7-((N-metylopiperazyno)metylo)kamptotecyna, która ma wyższą aktywność niż topotekan.⁷⁵ Innym przykładem dobrze rozpuszczalnej w wodzie pochodnej jest exatekan. Oszacowano, że aktywność przeciwnowotworowa exatekanu jest 28 razy większa, niż topotekanu.¹¹³ Znane są również pochodne będące czwartorzędowymi solami amoniowymi, oraz estry 20-O-fosforanowe kamptotecyny.^{104, 114, 115}

Pożądana trwałość laktonu w pierścieniu E zwiększa również zainteresowanie analogami o zwiększonej lipofilowości. Burke i inni opracowali serię pochodnych CPT zawierających krzem – silatekanów.¹¹⁶ Zunino i inni wprowadzili w pozycji C-7 podstawniki: aminometylowy, iminometylowy i oksyiminometylowy jako sposób na wzrost właściwości lipofilowych CPT.¹¹⁷ Dwa najbardziej obiecujące analogi o wysokiej cytotoksyczności to 7-(*tert*-butylodimetylosililo)-10-hydroksykamptotecyna (DB-67) i 7-(*tert*-butoksyiminometylo)kamptotecyna (gimatekan).^{117, 118} Pochodną o najwyższej do tej pory stabilności laktonu jest silatekan/homoCPT Du144.¹¹⁹

Kamptotecyna nie jest obecnie stosowana jako lek przeciwnowotworowy ze względu na niską rozpuszczalność w medium fizjologicznym i wysoką toksyczność. Dwie pochodne: topotekan i irinotekan są stosowane w wielu krajach w terapii przeciwnowotworowej. Wiele pochodnych kamptotecyny znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych, a już stosowane badane są pod

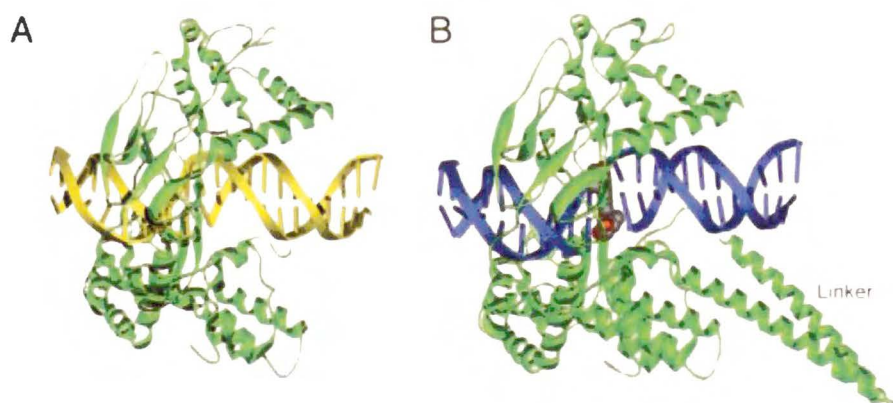
kątem rozszerzenia spektrum stosowalności. Opis zastosowań klinicznych kamptotecyn można znaleźć w wielu artykułach przeglądowych.^{120, 121}

6.1.2. Najważniejsze pochodne kamptotecyny

6.1.2.1. Topotekan

Topotekan (TPT, Hycamtin, GlaxoSmith Kline) jest półsyntetyczną pochodną kamptotecyny, zawierającą grupę *N,N*-dimetyloaminometylową w pozycji 9-C, która zapewnia cząsteczce rozpuszczalność w wodzie (rysunek 6.2). Topotekan został w 1996 roku zaaprobowany przez US FDA i jest obecnie zatwierdzonym w ponad 70 krajach lekiem w ponownym leczeniu (ang. *second-line treatment*) raka przerzutowego jajnika oraz w ponad 30 krajach w leczeniu pacjentów z rakiem drobnokomórkowym płuc (SCLC) po niepowodzeniu wcześniejszej terapii. Biologiczny czas półtrwania topotekanu jest znacznie krótszy niż dla innych pochodnych CPT, co powoduje, że w organizmie nie występuje akumulacja leku. Badane są możliwości stosowania topotekanu w połączeniu z paklitakselem, etopozydem, cis-platyną i cyklofosfamidem.¹²¹

Struktura rentgenograficzna trójskładnikowego kompleksu DNA - topo I – topotekan pokazuje, że TPT interkaluje od strony pęknięcia w DNA i jest stabilizowany oddziaływaniami typu „base-stacking” zarówno z parą zasad -1, jak i +1 (rysunek 6.3). Płaski pierścień topotekanu mimikuje parę zasad DNA i zajmuje to samo miejsce, co para zasad +1 w strukturze bez leku.⁵³ Podłużna oś cząsteczki TPT jest równoległa do osi par zasad, co różni się od publikowanych wcześniej modeli obliczeniowych dla CPT, przewidujących częściową interkalację prostopadle do podłużnej osi zasad -1 i +1.^{87, 88, 122} Interkalacja następuje dzięki rotacji wiązania fosfodiesterowego nierozciętej nici w pobliżu przerwy wywołanej aktywnością topoizomerazy. Nie wymaga rotacji zasad ani zerwania wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad, jak wcześniej przypuszczano.^{88, 122} Obserwowana rotacja wymaga odsunięcia się od siebie par zasad -1 i +1, co może być energetycznie korzystne ze względu na rotację wiązania fosfodiesterowego. Wiadomo również, że kamptotecyny lepiej stabilizują kompleks kowalencyjny, zawierający w pozycji +1 parę GC.¹²³



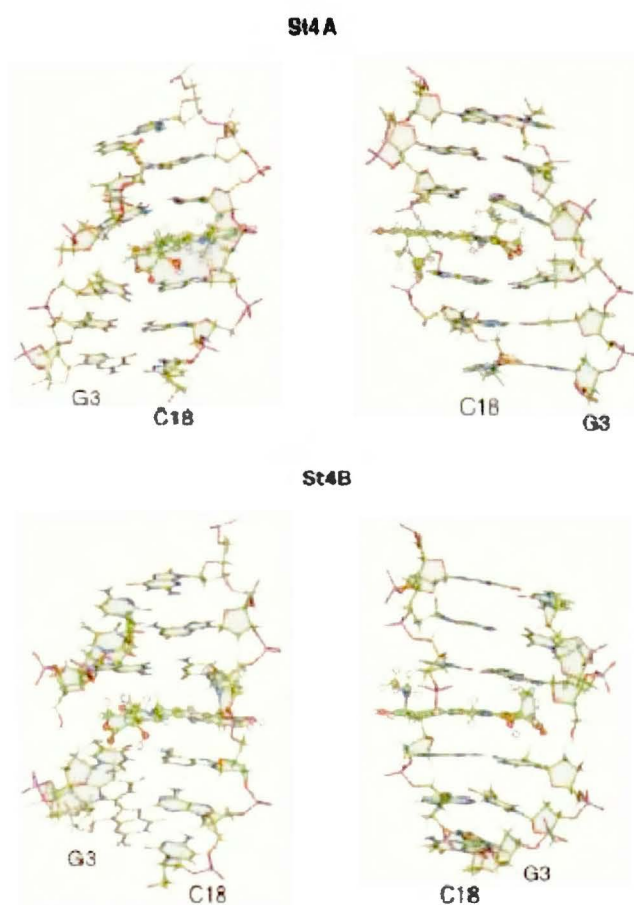
Rysunek 6.3. Struktura kompleksów a) DNA – topo I b) DNA – topo I – TPT. Topo I oznaczono kolorem zielonym, DNA żółtym (kompleks dwuskładnikowy) lub niebieskim (kompleks trójskładnikowy), TPT na szarym, czerwonym i niebieskim (odpowiednio atomy węgla, tlenu i azotu).⁵³

Te rezultaty nie wyczerpują tematyki struktury kompleksów trójskładnikowych. Możliwe, że kamptotecyny mogą wiązać się w innych miejscach lub przyjmować inną orientację. Otrzymana struktura rentgenograficzna może bowiem pochodzić od jednego układu zdolnego do krystalizacji. Ważnym zagadnieniem jest również powinowactwo obu form topotekanu (laktonu i karboksylanu) do DNA. Dla topotekanu przy pH = 6.28 (T = 25°C, c = 0.5 mM) lakton i karboksylan występują w roztworze w stosunku 1:1.¹²⁴

W obecności sekwencji DNA z przerwaną nicią (NICK I), topotekanu występuje w równowadze pomiędzy formą wolną i związaną z DNA. Współczynnik dyfuzji topotekanu jest więc średnią ważoną współczynników dyfuzji obu form, co umożliwiło obliczenie stałej wiązania.⁹ Analiza ta jest dość skomplikowana, ze względu na autoasocjację TPT w roztworze, która również wpływa na wielkość współczynnika dyfuzji. Wartość stałej asocjacji topotekanu wynosi $3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, a prześledzono ją za pomocą NMR, stosując model izodesmiczny.⁸³ Ponieważ lakton i karboksylan mają różne przesunięcia chemiczne, udało się wyznaczyć stałą wiązania dla obu form. Wyznaczone wartości K_a dla laktonu i karboksylanu wynoszą, odpowiednio, 3.78 i 0.1 mM^{-1} .⁹ Wyniki te potwierdzają, że powinowactwo karboksylanu do DNA jest bardzo słabe. Wniosek ten nie zgadza się z wynikami analizy krystalograficznej kompleksu trójskładnikowego, które wskazywały, że karboksylan może tak samo silnie jak lakton wiązać się z DNA.⁵³ Wcześniej zbadano powinowactwo topotekanu do oktameru o sekwencji $d(\text{GCGATCGC})_2$, a wartość K_a wyniosła 1.5 mM^{-1} .⁸³ Topotekanu oddziałuje więc mocniej z przerwaną nicią.

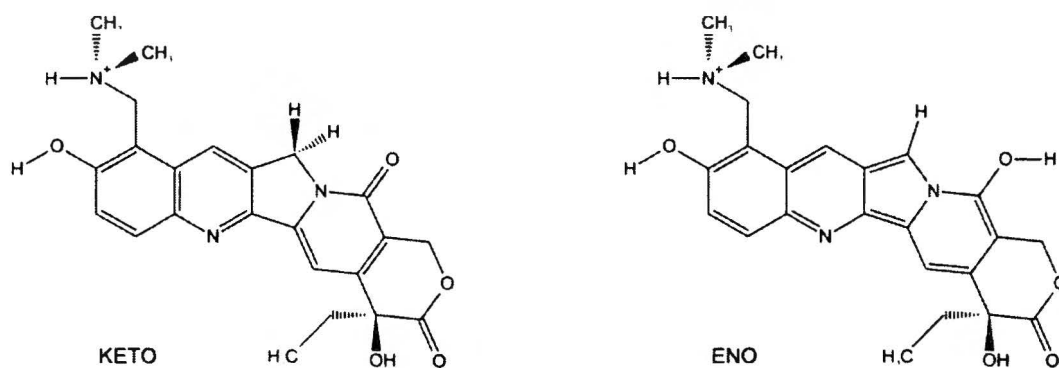
Wiązanie TPT do DNA wpływa również na kinetykę i równowagę karboksylan – lakton. W wolnym roztworze wodnym układ lakton – karboksylan osiąga równowagę w ciągu 2h przy pH 7,

a stosunek obu form wynosi odpowiednio 20:80 (lakton:karboksylan). W obecności DNA przy takim samym pH, równowaga ustala się po 24h, a stosunek obu form wynosi 1:1.⁹ Oddziaływanie z DNA spowalnia proces, ponieważ redukuje oddziaływanie laktonu z rozpuszczalnikiem. Zmiana ilości form świadczy o tym, że DNA faworyzuje formę laktonu. Autorzy przeanalizowali oddziaływania NOE, co w połączeniu z dynamiką molekularną (MD) wykazało, że topotekan wiąże się raczej w przerwie niż w mniejszej czy większej bruzdzie lub na końcach DNA. Wykorzystując modelowanie molekularne wygenerowano zestaw konformerów, które porównano z danymi doświadczalnymi. Struktury o najlepszym dopasowaniu pokazano na rysunku 6.4.⁹



Rysunek 6.4. Wizualizacja mniejszych bruzd struktur kompleksów przerwany dekamer – TPT, otrzymanych metodą MD. Dla przejrzystości pokazano jedynie sześć par zasad otaczających przerwę.⁹

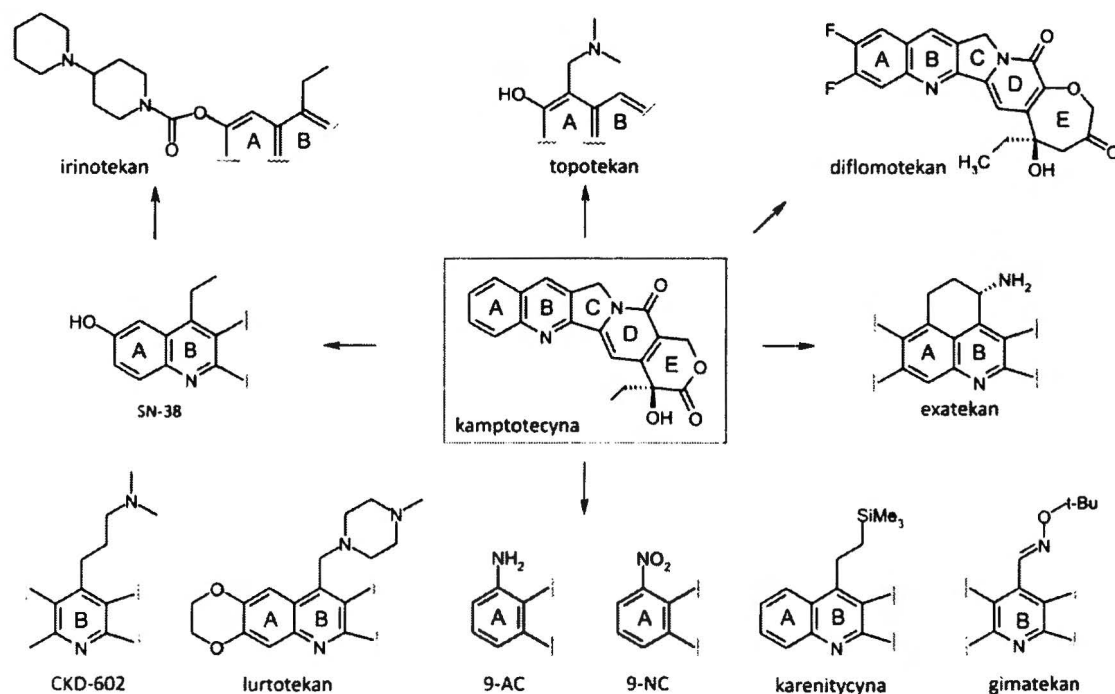
Ze względu na obecność grupy karbonylowej w pozycji C-16a, topotekan może występować w równowadze keto-enolowej¹²⁵ (rysunek 6.5). Obecność enolu nie została jednak dotychczas dowiedziona doświadczalnie.



Rysunek 6.5. Forma enolowa i ketonowa topotekanu.¹²⁵

6.1.2.2. Irinotekan

Irinotekan (Camptosar, Pfizer) jest rozpuszczalnym w wodzie związkiem, który zaprojektowano w celu ułatwienia pozajelitowego stosowania biologicznie aktywnej pochodnej 7-etylo-10-hydroksy-kamptotecyny (SN-38) (rysunek 6.6). Irinotekan zawiera fragment bispiperydynowy, przyłączony przez grupę karbonylową w pozycję C-10 (rysunek 6.6).



Rysunek 6.6. Najważniejsze związki z grupy kamptotecyn.⁸²

Sam irinotekan jest słabym inhibitorem topo I. Grupa karboksybispiperidynowa w obecności enzymu karboksyesterazy ulega hydrolizie do aktywnego metabolitu, 7-etylo-10-hydroksykamptotecyny, która jest 100 razy bardziej aktywnym inhibitorem topo I niż irinotekan.⁷⁹ Irinotekan został w 2000 roku zaakceptowany przez US FDA i jest obecnie szeroko stosowany, szczególnie w przypadku raka płuc i jelita grubego. Biologiczny czas półtrwania laktonowej formy SN-38 jest dłuższy niż w przypadku topotekanu.⁸² Toksyczność terapii irinotekaniem, ograniczająca maksymalne dawki, może prowadzić do mielosupresji. Niestety, w rezultacie skomplikowanych szlaków metabolicznych, irinotekan i jego metabolity podlegają znacznej zmienności farmakokinetycznej i farmakodynamicznej. Podjęto wiele prób mających na celu zrozumienie całościowego profilu farmakokinetycznego irinotekanu, jednak do dziś nie wpłynęło to w znacznym stopniu na przewidywanie występowania i stopnia efektów ubocznych terapii. Prowadzone są badania nad stosowaniem irinotekanu w kombinacji z taksanami, antracyklinami bądź czynnikami alkilującymi.⁸²

6.1.2.3. Exatekan

Exatekan (DX-8951f, DE-310, Daiichi Pharmaceuticals) jest syntetyczną, sześciocykliczną pochodną kamptotecyny (rysunek 6.6), rozpuszczalną w wodzie, znacznie hamującą rozwój nowotworowych linii komórkowych i ksenograftów, również nowotworów odpornych na irinotekan i topotekan. Wyniki fazy II testów klinicznych wskazują, że exatekan wykazuje niewielką aktywność wobec raka trzustki, żołądka i piersi. Efektem ubocznym jest neutropenia (obniżenie ilości granulocytów).^{77,82}

6.1.2.4. Gimatekan

Gimatekan (Sigma-Tau i Italian National Cancer Institute) jest półsyntetyczną, lipofilową pochodną z serii analogów 7-oksyiminometylowych (rysunek 6.6). Przy odpowiednim dawkowaniu gimatekan wykazuje akceptowalny profil toksyczności (dawkę ogranicza występowanie mielosupresji). W tej chwili gimatekan jest w II fazie badań klinicznych wobec zróżnicowanych typów nowotworów (jelita grubego, płuc, piersi oraz nowotworów dziecięcych).⁸²

6.1.2.5. Karenitecyna

Karenitecyna (BNP-1350, Bionumerik Pharmaceuticals) jest półsyntetycznym związkiem lipofilowym z grupy silatekanów (rysunek 6.6), wykazującym większą cytotoksyczną aktywność

niż kamptotecyna, zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Oprócz zwiększonej aktywności, karenitecyna charakteryzuje się wyższą stabilnością pierścienia laktonowego oraz biodostępnością, co potencjalnie zwiększa jej szanse w badaniach klinicznych. Karenitecyna wykazuje szczególną aktywność wobec czerniaka przerzutowego. Toksyczność może prowadzić do neutropenii i trombocytopenii (małopłytkowości). Obecnie karenitecyna jest w II fazie badań klinicznych.⁸²

6.1.2.6. Lurtotekan

Lurtotekan (NeXstar Pharmaceuticals) który jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem kamptotecyny, zawierającym fragment piperazynowy (rysunek 6.6). Stosowany jest w formie liposomowych kapsułek (NX211), które zapewniają przedłużony czas półtrwania. Charakteryzuje się aktywnością *in vivo* zbliżoną do topotekanu. Badania farmakologiczne i toksykologiczne ksenograftów wskazują, że enkapsulacja lurtotekanu skutkuje znacznym wzrostem wartości terapeutycznych (procentowe zahamowanie wzrostu nowotworu) oraz wyższym stężeniem w osoczu w porównaniu z wolnym lurtotekaniem i topotekaniem. Toksyczność może prowadzić do trombocytopenii i neutropenii. Jak dotąd, liposomowy lurtotekan wykazywał ograniczoną aktywność w II fazie badań klinicznych raka jajnika oraz nowotworów głowy i szyi.⁸²

6.1.2.7. 9-AC

9-AC, czyli 9-aminokamptotecyna, (IDEC-132, National Cancer Institute) jest półsyntetyczną pochodną kamptotecyny (rysunek 6.6) wykazującą aktywność przeciwnowotworową wobec szerokiego spektrum komórek. W II fazie badań klinicznych, podawany dożylnie, nie wykazywał jednak wystarczającej aktywności. Aby zwiększyć biodostępność, zmieniono sposób podawania. Obecnie 9-AC w połączeniu z poli(glikolem etylenowym) podaje się doustnie i lek ten jest w II fazie badań klinicznych w Europie.^{77, 82}

6.1.2.8. Rubitekan

Rubitekan czyli 9-nitro-kamptotecyna (9-NC, Oratecyna, SuperGen) to silnie działający lecz słabo rozpuszczalny w wodzie analog kamptotecyny (rysunek 6.6). W organizmie rubitekan jest konwertowany metabolicznie do 9-amino-kamptotecyny (9-AC), jest jednak tańszy do otrzymania i mocniejszy w działaniu w porównaniu z 9-AC. Przed badaniami klinicznymi rubitekan wykazywał aktywność wobec szerokiego spektrum komórek nowotworowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jednak w trakcie I i II fazy badań klinicznych rubitekan wykazywał

niezadawalającą aktywność wobec większości nowotworów, za wyjątkiem raka trzustki oraz jajnika. Badania kliniczne rubitekanu w terapii raka trzustki są kontynuowane. Prowadzone są również badania I fazy nad liposomowym 9-NC, podawanym inhalacyjnie.^{5, 82}

6.1.2.9. Diflomotekan

Diflomotekan (BN-80915, Beaufour Ipsen), pochodna zawierająca pierścień 7-członowy w miejsce pierścienia E (rysunek 6.6) hydrolizuje do karboksylanu wolniej niż kamptotecyna, lecz po hydrolizie pierścień nie może się już ponownie zamknąć. Diflomotekan jest obecnie w II fazie badań klinicznych wobec zaawansowanych nowotworów przerzutowych: jelita grubego, piersi i prostaty.⁸²

6.1.2.10. CKD-602

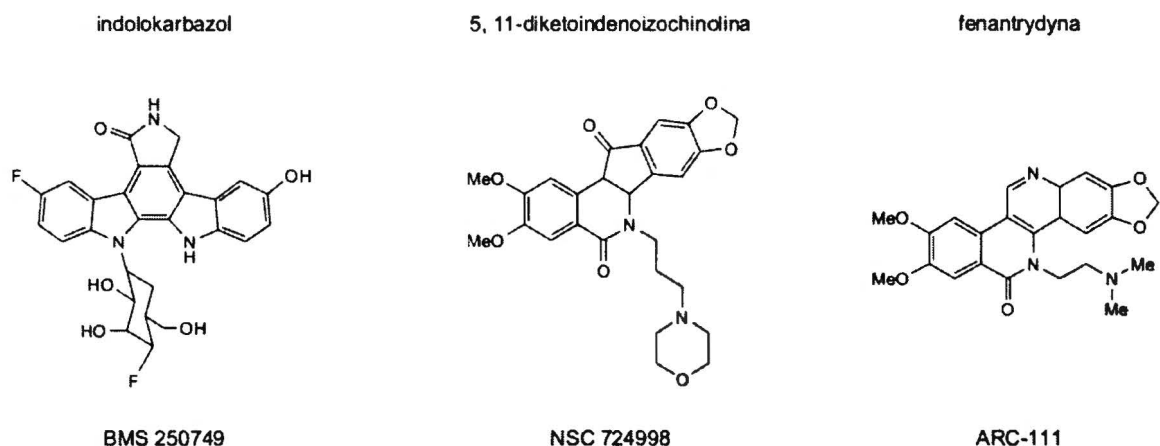
CKD-602 (Chong Kun Dang Pharmaceuticals) jest analogiem kamptotecyny o dobrej rozpuszczalności (dzięki obecności grupy dimetyloaminowej) (rysunek 6.6) i akceptowalnym profilu toksyczności. Obecnie jest w II fazie badań klinicznych.⁸²

6.1.2.11. Protekan

Protekan (Prothecan, Enzon Inc.) składa się z cząsteczka kamptotecyny połączonej z poli(glikolem etylenowym). Związek ten jest obecnie w II fazie badań klinicznych.⁷⁷

6.1.3. Inne inhibitory topoizomerazy I

Poszukiwania inhibitorów topo I innych niż kamptotecyny rozpoczęły się natychmiast po odkryciu inhibicji topo I przez CPT. Badania doprowadziły do odkrycia nowych klas związków inhibujących topo I, takich jak indolokarbazole i fenantrydyny. Związki z obu grup są obecnie w trakcie badań klinicznych. Obiecującą grupę stanowią też indenoizochinoliny (rysunek 6.7).



Rysunek 6.7. Inhibitory topo I inne niż CPT.⁷⁷

W literaturze wymienia się również takie związki jak terbenzimidazole, flawony, bulgareina i inne.⁸⁰ Inhibitory te nie będą tu szczegółowo omawiane, gdyż nie jest to celem tej pracy. Informacje dotyczące struktury, aktywności oraz zaawansowania badań można znaleźć w artykułach przeglądowych.^{126, 127, 128}

6.2. Inhibitory topoizomerazy II

6.2.1. Flawonoidy

Flawonoidy są grupą ponad 4000 naturalnych związków polifenolowych, posiadających fragment fenylobenzopirany. Ze względu na stopień nasycenia oraz obecność grup karbonylowych lub hydroksylowych dzieli się je na flawony, flawonole, flawanony, flawanole, flawanonole i izoflawony (tabela 6.2).¹²⁹

Flawonoidy są obecne w większości roślin jadalnych i są spożywane w znacznych ilościach. Szacuje się, że przeciętnie człowiek spożywa kilkaset miligramów flawonoidów dziennie.¹³⁰ Flawonoidy występują również w wielu ziołach i roślinach stosowanych w medycynie ludowej na całym świecie.¹³¹ Związki te charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznych: przeciwzapalnych, przeciwalergicznych, przeciwutleniających czy przeciwnowotworowych.¹²⁹ Wymienia się je wśród związków przeciwdziałających chorobom układu krążenia i osteoporozie, ale także wśród czynników wywołujących specyficzne białaczki niemowlęce.¹³² W ostatniej dekadzie widoczny jest wzrost zainteresowania flawonoidami i ich analogami jako lekami przeciwnowotworowymi. Flawonoidy są wymieniane wśród nowych inhibitorów topo II,¹³³ a niektóre (luteolina) także wśród inhibitorów topo I.^{134, 135} Dwa izoflawony: genisteina i orobol są

inhibitorami topozomerazy II o aktywności porównywalnej z amsakryną i etopozydem – lekami powszechnie stosowanymi jako inhibitory topo II. Aktywność przeciwnowotworowa dwóch flawonów: fizetyny i kwercetyny jest zbliżona do aktywności adriamycyny.⁶ Znane są również związki o nietypowym, niearomatycznym pierścieniu C, jednak mają one słabe właściwości cytotoksyczne.¹³⁶

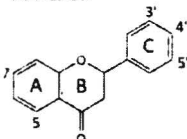
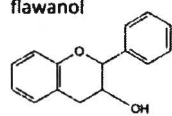
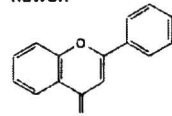
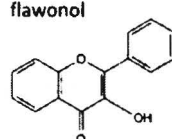
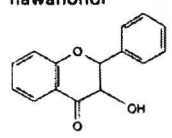
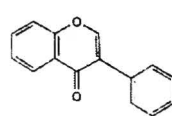
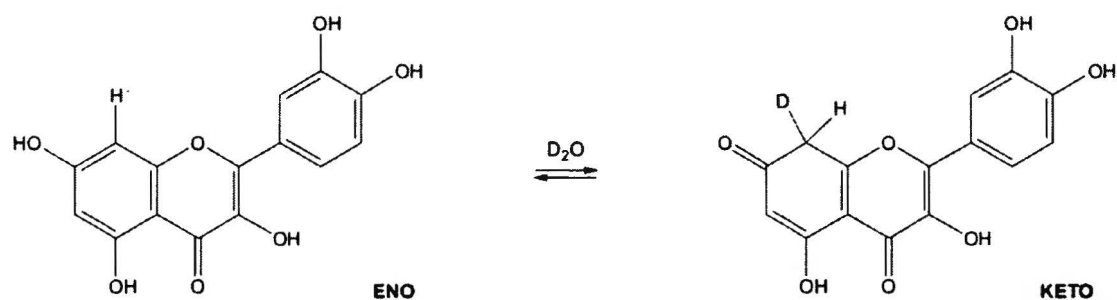
struktura	przykładowe związki	podstawniki					występowanie
		5	7	3'	4'	5'	
flawanon 	eriodiktiol hesperytyna naringenina	OH OH OH	OH OH OH	OH OH H	OH OMe OH	H H H	cytrusy
flawanol 	katechina galkatechina	OH OH	OH OH	OH OH	OH OH	H OH	jabłka, herbata
flawon 	diosmetyna apigenina kryzyna luteolina	H OH H OH	H OH OH OH	OH H H OH	OMe OH H OH	H H H H	pietruszka, tymianek
flawanol 	fizetyna kamferol myricetyna kwercetyna	H OH OH OH	H OH OH OH	OH H OH OH	OH OH OH OH	H H OH H	cebula, wiśnie, jabłka, brokuły, kapusta, pomidory, jagody, czerwone wino, herbata, kasza gryczana
flawanonol 	taksifolin	OH	OH	OH	OH	H	cytryny
izoflawon 	daidzeina genisteina biochanina A orobol	H OH OH OH	OH OH OH OH	H H H OH	OH OH OMe OH	H H H H	soja, rośliny bobowate

Tabela 6.2. Struktura związków z grupy flawonoidów.^{129, 132, 137}

S. Faizi i inni zauważyli dla kilku flawonoidów (m. in. kwercetyny, luteoliny, kamferolu i apigeniny) występowanie tautomerii keto-enolowej. Równowagę tę obserwowano metodą NMR, ponieważ w deuterowanych rozpuszczalnikach donorowych następuje regioselektywne

deuterowanie pozycji C-8 (rysunek 6.8). Dla kilku flawonoidów przeprowadzono analizę wpływu rodzaju podstawnika, rozpuszczalnika i temperatury na proces wymiany H/D.¹³⁸



Rysunek 6.8. Równowaga keto-enolowa obserwowana dla kwercetyny.¹³⁸

W poszukiwaniu izoflawonów o zwiększonej cytotoksyczności, otrzymywano wiele pochodnych, które wykorzystano w badaniach *in vivo* i *in vitro*. Przykładem jest fenoksodiol (3-(4-hydroksyfenyl)-2H-chromen-7-ol), który wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej a także uwrażliwia komórki rakowe na inne cytostatyki. Fenoksodiol jest obecnie w fazie badań klinicznych w Stanach Zjednoczonych, Europie i Australii.¹³⁹

Ze względu na słabą rozpuszczalność (a co za tym idzie, również biodostępność), przeprowadzano próby podawania genisteiny w formie polimerycznych miceli. Ilość genisteiny uwolnionej z takich miceli w porównaniu z typową genisteiną była większa zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*.¹⁴⁰ Luteolinę, apigeninę i kryzynę przeprowadzono w formę kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami, a rozpuszczalność takich układów była większa niż samych flawonoidów.¹⁴¹ W celu poprawy aktywności biologicznej, zsyntetyzowano również kilka estrów kwasów tłuszczowych genisteiny i daidzeiny. Oczekiwano, że te mocno lipofilowe pochodne będą poprzez lipoproteiny niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL) efektywnie przenikać do tkanek. Stężenia otrzymanych pochodnych w fazie LDL były większe niż stężenia flawonoidów, ale większą aktywność wykazywał tylko 4', 7-dilinoleinian daidzeiny.¹⁴² Otrzymano również pochodne genisteiny i daidzeiny o zwiększonej rozpuszczalności w wodzie, 7-O-fosforany, nie ma jednak doniesień o poziomie ich aktywności.¹⁴³ Znane są także pochodne genisteiny w postaci eteru 7-O-sililowego i czwartorzędowej soli amoniowej.¹⁴⁴ O-metylowanie flawonoidów zwiększało ich stabilność, biodostępność i cytotoksyczność, a także, zaskakująco, rozpuszczalność w wodzie.¹⁴⁵ W celu poprawy biodostępności kwercetyny, do pierścienia B przyłączono przez łącznik karbaminianowy dziewięć różnych aminokwasów. Wśród otrzymanych pochodnych, koniugat kwercetyny i kwasu glutaminowego charakteryzował się znacznie

zwiększoną rozpuszczalnością i stabilnością w porównaniu z kwercetyną.¹⁴⁶ Dużą grupę pochodnych zawierających różne podstawniki w pozycjach 4'-O oraz 7'-O zsyntetyzowali w ostatnim czasie naukowcy z Chin. Pochodne te były badane między innymi pod kątem właściwości przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych, a kilkanaście z nich (zawierających podstawniki z grupami karboksylowymi, karboksylanowymi, tioeterowymi, alkilopirydynylowymi, chlorowcoalkilowymi) wykazywało również właściwości cytotoksyczne.^{147, 148, 149, 150, 151, 152} Ze względu na powinowactwo flawonoidów do receptorów estrogeny, proponowano wykorzystanie genisteiny jako „nośnika” innych leków cytostatycznych. Koniugat 6-karboxymetylogenisteiny z daunomycyną przy niskich dawkach wykazywał wyższą cytotoksyczność niż sama daunomycyna.¹⁵³ Grupa tych samych naukowców otrzymała niedawno pochodne genisteiny, biochaniny A i daidzeiny poprzez przyłączenie grupy *N*-tert-butoksykarbonylo-1,6-diamino-heksylowej. Z tych związków, pochodna daidzeiny charakteryzowała się wysoką aktywnością antyproliferacyjną przy jednoczesnym braku toksyczności.¹⁵⁴

Znaczącym krokiem w poszukiwaniach pochodnych genisteiny o wyższej aktywności przeciwnowotworowej była synteza dziewięciu glikozydów genisteiny, z których kilka inhibowało *in vitro* proliferację linii komórkowych.^{155, 156} Najbardziej aktywnym związkiem była pochodna oznaczona symbolem G21 (7-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozylo)-(1→4)-(6-O-acetylo-heks-2-en-α-D-erytropiranozylo)genisteina).¹⁵⁷

6.2.1.1. Genisteina

Genisteina jest jednym z najprostszych izoflawonów (tabela 6.2). Została po raz pierwszy wyizolowana z janowca barwierskiego (*Genista tinctoria*) w 1899 roku przez Perkiną i Newbury'ego.¹⁵⁸ Syntetyczną genisteinę po raz pierwszy otrzymali w 1928 roku Baker i Robinson.¹⁵⁹ Pierwsze doniesienia, że genisteina inhibuje topo II pojawiły się na przełomie lat 80/90-tych XX wieku, a jej aktywność porównuje się z aktywnością powszechnie stosowanych inhibitorów topo II, amsakryną i etopozydem.^{160, 161} Genisteina, która występuje w znacznych ilościach w soi, jest uznawana za czynnik chemoprewencyjny, zapobiegający wystąpieniu raka piersi i prostaty. Z tego powodu inżynieria genetyczna podejmuje próby stworzenia roślin transgenicznych, które zawierałyby genisteinę (np. kukurydza, tytoń).¹⁶²

Genisteina wykazuje aktywność wobec komórek raka piersi, tarczycy, gardła, prostaty i okrężnicy.¹²⁹ Znane są również doniesienia wskazujące, że genisteina zwiększa aktywność cytostatyczną wielu leków, np. cisplatyny, doksorubicyny, prednizonu etc.¹³⁹

Niedawne badania wskazują, że komórki niezawierające topoizomerazy II są odporne na działanie genisteiny, co dowodzi, że cytotoksyczność genisteiny związana jest z inhibicją tego enzymu.¹⁶³ Genisteina jest jednym z 16 związków wybranych do klinicznych prac badawczych przez National Cancer Institute.¹⁶⁴ Aktualnie genisteina jest przedmiotem ponad 20 badań klinicznych tylko w Stanach Zjednoczonych, dotyczących między innymi osteoporozy i raka. Co najmniej trzy farmaceutyki zawierające zdefiniowaną ilość genisteiny są dostępne na rynku. Są to: GCM™ (zawierający genisteinę polisacharyd, Amino Up Chemical Co., Japonia), stosowany jako lek przeciwnowotworowy; Bonistein™ (DSM Nutritional Products, Holandia) i Fosteum™ (Primus Pharmaceuticals, USA), oba stosowane w profilaktyce osteoporozy.¹⁵⁷

Pomimo dużego zainteresowania genisteiną i jej pochodnymi, jej geometria i własności elektronowe nie były szeroko badane. Niewiele jest publikacji opisujących widma NMR,^{165, 166, 167} strukturę rentgenograficzną genisteiny¹⁶⁸ lub wykorzystujących metody obliczeniowe.¹⁶⁹ Kilka tego rodzaju prac pochodzi z zespołu prof. Kozerskiego,^{170, 171, 172, 173} i dotyczą one kompleksów genisteiny z aminami. Mimo ogromnej ilości prac biochemicznych, podejmujących tematykę działania inhibitorów topo II na poziomie komórkowym, brakuje informacji dotyczących mechanizmu działania tej klasy związków na poziomie atomowym. Znane są wartości stałych trwałości kompleksowania genisteiny, kwercetyny i luteoliny do oligomerów DNA i wynoszą one odpowiednio: $K_a = 1.54 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, $5.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $2.17 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.¹⁷³ Wynika z tego, że genisteina oddziałuje najslabiej z trzech zbadanych inhibitorów. Fragment genisteiny w labilnym kompleksie piperazynowym, lepiej rozpuszczalnym w wodzie niż zwykła genisteina, oddziałuje z taką samą siłą. Możliwym wyjaśnieniem tej sytuacji jest nieplanarność fragmentu genisteiny w porównaniu z innymi flawonoidami. Struktura rentgenograficzna kompleksów genisteiny z morfoliną i piperazyną wskazuje, że pierścień C nie jest koplanarny z pierścieniami A i B i jest skręcony o ok. 57°. Dodatkowo, silne wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe grupy C-5 hydroksylowej do węgla C-4 karbonylowego wprowadza dodatkowy, sześcioczłonowy pierścień do struktury. O ile ta ostateczna właściwość sugeruje, że genisteina może interkalować do DNA, o tyle jej całkowita nieplanarność stwarza zawadę przestrzenną, dlatego można oczekiwać, że cząsteczka będzie raczej oddziaływać w mniejszej bruździe DNA. Potwierdza to widmo NOESY roztworu genisteiny i oligomeru DNA, na którym nie były widoczne międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne, a różnice przesunięć chemicznych protonów cukrowych i iminowych są zaniedbywalne.¹⁷³

6.2.1.2. Kwercetyna

Kwercetyna jest bodajże najlepiej zbadanym flawonoidem (tabela 6.2). Charakteryzuje się bardzo słabą biodostępnością, ze względu na skomplikowany metabolizm,¹⁷⁴ jest natomiast aktywna wobec komórek raka gardła, piersi, płuc, prostaty, okrężnicy oraz wobec białaczek.¹²⁹ Kwercetyna jest inhibitorem topo II. W wielu pracach pojawiały się sugestie o inhibowaniu przez kwercetynę również topo I,^{175,176} jednak ostatnie badania zaprzeczają tym doniesieniom.¹⁷⁷ Kwercetyna jest interkalatorem DNA, ale sądzi się, że uszkodzenie DNA może przebiegać poprzez więcej niż jeden mechanizm.¹⁷⁶

6.2.1.3. Luteolina

Luteolina charakteryzuje się aktywnością wobec komórek raka piersi, tarczycy i prostaty.¹²⁹ Działa jak inhibitor topo II, ale kilka prac sugeruje, że jest aktywna również jako inhibitor topo I (tabela 6.2).^{134,178,179}

6.2.2. Inne inhibitory topoizomerazy II

Do najbardziej rozpowszechnionych inhibitorów topo II należą: epipodofilotoksyny (etopozyd i tenipozyd), antracykliny (doksorubicyna, daunorubicyna), mitoksantron, eliptycyna, amsakryna, kumaryna, netropsyna i inne.^{129,133}

6.3. Inhibitory podwójne

W literaturze znane są związki, będące inhibitorami topoizomerazy I i II. Są to zarówno związki pochodzenia naturalnego (fizetyna, myrtecyna,¹⁷⁷ sanguina, saintopina, fagaronina), jak i syntetyczne (intoplicyna i jej analogi a także koniugaty: distamycyny i eliptycyny, kamptotecyny i 4'-O-demetyloepipodofilotoksyny, antracenyli i dipeptydów.¹²⁹

7. Zastosowanie metod NMR do badania oddziaływań nukleotydów

Magnetyczny rezonans jądrowy po raz pierwszy został zastosowany do badań DNA już rok po odkryciu struktury podwójnej helisy (1953). Wyjaśnienie struktury DNA otworzyło w biologii molekularnej nową erę dla badaczy. Pomimo tego, że łańcuchy DNA były zdecydowanie zbyt duże (200 - 800 kDa) do badań NMR w roztworze, to takie sekwencje jak promotory (odcinki, od których polimeraza RNA rozpoczyna kopiowanie genu) czy operatory (sekwencje, do których wiąże się białko regulatorowe), składające się z 10 – 20 par zasad, mogły być łatwo analizowane za pomocą wielowymiarowych eksperymentów NMR. Badania NMR oligonukleotydów pozostawały w tyle w stosunku do badań nad białkami, ze względu na ograniczoną dostępność próbek. Wraz z rozwojem syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, sytuacja zmieniła się dramatycznie; rozpoczęto badania nad całą gamą sekwencji DNA o różnej strukturze drugorzędowej. Ogólnie biorąc, w zdecydowanej większości badań NMR opublikowanych dotychczas, używano syntetycznych oligonukleotydów. Możliwa jest obserwacja pojedynczych nici, szpilek, dupleksów komplementarnych nici, tripleksów, kwadrupleksów oraz wielu struktur zawierających wypukłości (ang. *bulge*), zgięcia (ang. *bend*) i inne zaburzenia. Co więcej, możliwa jest obserwacja oddziaływań DNA z ligandami, takimi jak leki i małe cząsteczki, a także z wiążącymi się białkami oraz wyznaczenie struktury takich układów.¹²

Razem z uracylem, w oligonukleotydach występuje tylko 5 rodzajów zasad (a w DNA tylko 4), co w porównaniu z białkami (20 naturalnych aminokwasów) znacznie upraszcza przypisanie sygnałów w widmie ^1H NMR. Z drugiej strony, niewielkie zróżnicowanie reszt nukleotydowych jest przyczyną nakładania się sygnałów, co znacznie utrudnia analizę strukturalną (w porównaniu z białkami). Struktura DNA zależy od oddziaływań zasada – zasada, zaprezentowanych na rysunku 3.3 (rozdział o DNA), na którym pokazano typowe oddziaływania Watsona – Cricka.

Pierwszym krokiem przy opisie widm oligonukleotydów jest identyfikacja układów spinowych. Dokonuje się tego w oparciu o przesunięcia chemiczne podane w tabeli 7.1. W obrębie podstawowej jednostki nukleotydu występują dwa odrębne układy spinowe: jeden obejmujący resztę cukrową, a drugi zasadę. Sieć sprzężeń najłatwiej identyfikować zaczynając od interpretacji widma TOCSY, pokazującego połączenia wzdłuż ścieżki $\text{H1}' \rightarrow \text{H2}'/\text{H2}'' \rightarrow \text{H3}' \rightarrow \text{H4}' \rightarrow \text{H5}'/\text{5}''$ w każdej jednostce cukrowej oraz korelacje protonów w zasadach pirymidynowych: H6, H5 w cytozynie i H6, Me w tyminie. Reszty cukrowe i zasady tego samego nukleotydu dają sygnały korelacyjne w widmie NOESY wg schematu: $\text{H1}'/\text{H2}'$ (i) – H8/H (i) przez wiązania, natomiast oddziaływania przez przestrzeń wzdłuż ścieżki $\text{H1}'/\text{H2}'/\text{H2}''$ (i-1) \rightarrow H8/H6 (i) \rightarrow $\text{H1}'/\text{H2}'$ (i) oraz H8/H6 (i) \rightarrow H5/Me (i+1) prowadzą do przypisań wzdłuż nici. Wykonanie widm

TOCSY i NOESY oligonukleotydów umożliwia więc przypisanie wszystkich protonów na widmie. Identyfikacja sygnałów protonów iminowych oraz H2 w adeninie wymaga zarejestrowania widm w H₂O.¹²

δ (ppm)	przypisanie
1.2 - 1.6	Me w T
1.8 - 3.0	2'H, 2''H
2.7 - 4.5	4'H, 5'H i 5''H
4.4 - 5.2	3'H
5.3 - 6.3	1'H
5.3 - 6.0	5H w C
7.1 - 7.6	6H w C i T
7.3 - 8.4	8H w A i G, 2H w A
6.6 - 9.0*	NH ₂ w A, C i G
10 - 15*	NH w G i T

Tabela 7.1. Przybliżone zakresy przesunięć ¹H NMR w dupleksach i pojedynczych niciach DNA¹⁸⁰
*obserwowalne tylko w H₂O.

Metodyka badania kompleksów molekularnych w tej pracy zawiera najczęściej:

- zastosowanie pomiarów współczynnika dyfuzji translacyjnej z eksperymentu PFGSE (ang. *Pulsed Field Gradient Spin Echo*) NMR, umożliwiających zbadanie stanu asocjacji liganda organicznego w środowisku fizjologicznym, jak również wyznaczenie stałej równowagi kompleksów inhibitor/DNA;¹⁸¹
- wyznaczenie struktur kompleksów przy użyciu więzów eksperymentalnych (NMR) i metod modelowania molekularnego z uwzględnieniem przypadków równowagi konformacyjnej oraz wpływu rozpuszczalnika.

Pomiary współczynnika dyfuzji

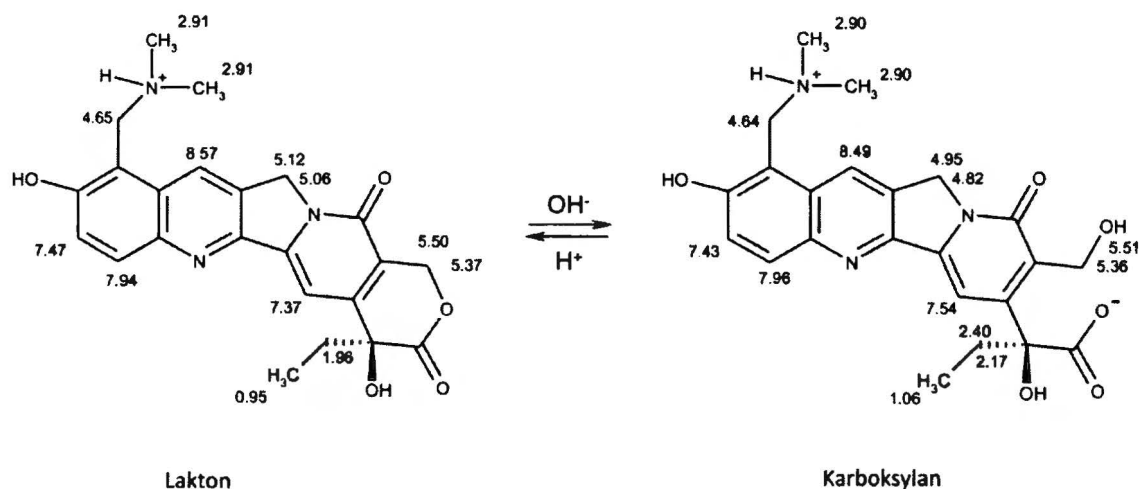
W eksperymencie PFGSE mierzone są parametry fizykochemiczne, które są wrażliwe na rozmiar i kształt cząsteczki. Jest to przykład wykorzystania techniki PFG, która bardzo poszerzyła zastosowanie spektroskopii NMR do badania małych i dużych cząsteczek. Współczynnik dyfuzji translacyjnej D ; $\times 10^{-10}$, [$m^2 s^{-1}$], umożliwia oszacowanie rozmiarów cząsteczek, ponieważ jest różny dla związków znacznie różniących się ciężarem cząsteczkowym.^{182, 183, 184}

WYNIKI I DYSKUSJA

8. Zagadnienia inhibicji topoizomerazy I

8.1. Charakterystyka topotekanu w środowisku fizjologicznym

Badania nad strukturą topotekanu w wodzie są szczególnie istotne, ponieważ jest to środowisko zbliżone do fizjologicznego. Chociaż TPT jest stosowany w medycynie od kilkunastu lat, jego tautomeria nie jest w pełni opisana. Podstawowa znana równowaga (schemat 8.1) dotyczy zależnej od pH transformacji formy laktonowej do karboksylanowej. Po rozpuszczeniu TPT x HCl w wodzie ustala się pH 4.5, a około 95% związku pozostaje w formie laktonowej. Przesunięcia chemiczne są wrażliwe na pH (*vide* porównanie z przesunięciami chemicznymi w tabeli 8.4, przy pH 5.1). Większość badań biologicznych wskazuje, że karboksylanowa forma TPT nie działa jako inhibitor topo I.

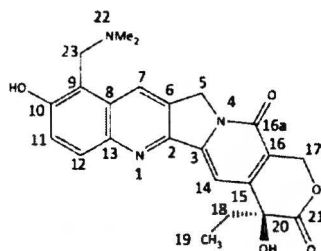


Schemat 8.1. Równowaga form TPT x HCl oraz ich przesunięcia chemiczne w D₂O, pH 4.5.

8.1.1. Czasy relaksacji ¹H-T₁ i wzmocnienie NOE

Zbadanie ruchów molekularnych oraz stanu agregacji topotekanu w wodzie wydaje się kluczowe, ponieważ TPT jest jednym z ważniejszych inhibitorów topo I oraz wiodącym związkiem z rodziny kamptotecyn. Założono, że wartości parametrów opisujących zachowanie topotekanu w roztworze będą zbliżone dla innych pochodnych TPT badanych w tej pracy. Przeanalizowano więc czasy relaksacji, ¹H-T₁, oraz wartości NOE dla chlorowodoru topotekanu w buforze

wodnym. Wyznaczone wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania NOE mogą służyć również jako odnośnik w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych TPT z DNA. Aby oszacować czasy korelacji dla TPT w buforze wodnym oraz wewnątrzcząsteczkowe efekty Overhausera, zmierzono T_1 oraz wzmocnienie NOE w trzech temperaturach: 30, 13 i 3°C. Jako odnośnik wykorzystano roztwór TPT w $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$ (4:2 v/v) (tabela 8.1).



Proton/ Temperatura	T_1 (s)		
	30°	13°	3°
7-H	0.72 ± 0.1	0.89 ± 0.03	0.97 ± 0.03
12-H	1.93, 2.01 ± 0.54	2.40, 2.45 ± 0.11	2.37, 2.34 ± 0.09
11-H	1.76, 1.89 ± 0.44	2.34, 2.4 ± 0.11	2.37, 2.47 ± 0.11
14-H	2.91 ± 0.65	3.08 ± 0.13	2.70 ± 0.11
NMe ₂	0.51, 0.52 ± 0.01	0.44, 0.44 ± 0.01	0.41, 0.41 ± 0.01
18-CH ₂	0.34, 0.35 ± 0.03	0.43, 0.43 ± 0.004	0.49, 0.50 ± 0.01
19-CH ₃	0.58, 0.61, 0.59 ± 0.05	0.64, 0.67, 0.66 ± 0.02	0.64, 0.65, 0.65 ± 0.03

Tabela 8.1. Porównanie czasów relaksacji T_1 dla TPT x HCl w różnych temperaturach w buforze wodnym. Użyto roztworu 0.3 mg chlorowodorku TPT w 600 μL buforu D_2O (50 mM NaCl, 50 mM K_3PO_4), pH 5. Nie podano wartości dla sygnałów położonych blisko sygnału wody, tj. od grup 5, 23, 17- CH_2 .

Zmiana wartości T_1 wraz ze zmianą temperatury jest czułym wskaźnikiem ruchów molekularnych i pośrednio, stanu agregacji. Dane z tabeli 8.1 jasno wskazują na tendencję charakterystyczną dla dużych cząsteczek, leżących poza zakresem określanym w literaturze jako „extreme narrowing regime”. Wraz ze spadkiem temperatury, wartość T_1 dla protonów aromatycznych 7-H, 12-H, 11-H oraz protonów 18- CH_2 wzrasta, dla grupy dimetyloaminowej spada, podczas gdy dla protonów 19- CH_3 jest zasadniczo stała. Dowodzi to, że protony należące do głównego szkieletu są opisane zależnością $\omega\tau_c \gg 1$, czyli „wpadają” w reżim dużych cząsteczek, charakteryzujących się ujemnymi wartościami NOE. Grupy boczne mają znacznie krótsze czasy korelacji, a ich rotacyjny czas korelacji opisany jest równaniem $\omega\tau_c \ll 1$, obserwowanym w rejonie „extreme narrowing regime” i dodatnich wartości NOE. Obniżeniu temperatury towarzyszy wzrost lepkości rozpuszczalnika, co powinno skutkować zmniejszeniem wszystkich czasów relaksacji. Dla protonów głównego szkieletu widoczny jest jednak trend

odwrotny, który nie może pochodzić od wzrostu lepkości rozpuszczalnika. Musi to być wynikiem różnych czasów korelacji szkieletu i grup bocznych. Jest to widoczne w przypadku porównania T_1 w 30° i 13°C, podczas gdy porównanie wartości T_1 w 13° i 3°C sugeruje, że oba efekty konkurują ze sobą. Eksperyment ten dowodzi, że w temperaturze pokojowej w buforze wodnym, cząsteczki topotekanu tworzą klaster, które obracają się powoli w roztworze. Powinno to wpływać na wzrost ujemnych wartości NOE wraz z obniżaniem temperatury.

W tabeli 8.2 podano wartości „steady state” NOE dla wodnego roztworu TPT w 30°, 13° i 3°C. Dla porównania, w 30°C podano wartości DPGSE NOE¹⁸⁵ oraz ROE. Tak jak oczekiwano, widać że w buforze wodnym w 30°C wzmocnienia wewnątrzcząsteczkowe są prawie zerowe, a w tym samym czasie wzmocnienie międzycząsteczkowe jest widoczne w całej cząsteczce TPT.

Proton naświetlany	Proton obserwowany / NOE (%)						
	7-H	12-H	11-H	14-H	23-CH ₂	18-CH ₂	19-CH ₃
7-H	*	-1.0 -1.6	-0.9 -1.3 -2.5	-1.5 -1.0 0.7	(0; 16.9) - -19.6	-0.1 -0.6 -	-1.0 -0.8
12-H	-0.6 -1.2 -3.2	* *	-1.1 (-1.0; 10.8) -18.4 -33.7	-3.2 -3.2 -4.5	 -8.2	-2.4 -3.7 -3.1	-1.5 -2.9 -2.0
11-H	2.9 -0.5 -0.7	1.2 (0.8; 7.0) -16.8 -29.3	* 	-4.9 -4.0 -5.6	 	4.1 - 2.0	3.2 0.5 -1.1
14-H	2.9 2.1	1.4 0.4 -1.4	-0.8 -5.9	* 	 -5.9	2.8 0.4	2.7 0.6 0.9
23-CH ₂	-54.9	-7.3	-8.9	-3.2	*	-3.0	-2.4
18-CH ₂	0.5 -1.4	0.2 -1.6 -2.1	0.9 -6.7	3.5 -2.3 -6.7	 	* 	5.7 (3.8; 7.0) 0.4 -4.9
19-CH ₃	1.2 -2.7	1.1 -3.3	1.1 -1.9 -3.4	3.9 -3.1 -6.8	 	4.0 (2.3; 3.5) -1.8 -2.1	*

Tabela 8.2. Porównanie wzmocnień NOE w TPT x HCl w buforze wodnym w różnych temperaturach. Roztwór 0.3 mg TPT x HCl w 600µL buforu D₂O (50 mM NaCl, 50 mM K₃PO₄), pH 5. Wartości podano od góry, odpowiednio dla 30, 13 i 3°C; w 30°C dla porównania podano wartości DPGSE NOE i ROE (w nawiasach). Nie podano wartości mniejszych niż 0.4 (wartość bezwzględna). Protony 23-CH₂ nie były naświetlane w 30 i 13° C, ze względu na ich nakładanie się z resztkowym sygnałem HOD.

DPGSE ROE w kilku przypadkach pokazuje większy, dodatni efekt międzycząsteczkowy w porównaniu z DPGSE NOE w tych samych warunkach. Ze spadkiem temperatury oba efekty: wewnątrzcząsteczkowy (np. 11-H vs 12-H) i międzycząsteczkowy stają się większe (co do

wartości bezwzględnej) i ujemne. Jest to dowód, że autoasocjacja TPT w buforze wodnym występuje nawet przy badanych, bardzo niskich stężeniach. Zmiana wartości NOE z niewielkiej, dodatniej w 30°C na dużą, ujemną w 13°C dowodzi, że ruchy molekularne klasterów topotekanu osiągają czasy korelacji charakterystyczne dla biocząsteczek. Potwierdza to również, że w temperaturze pokojowej i przy częstotliwości rezonansowej 500 MHz klaster te mają rotacyjne czasy korelacji spełniające warunek $\omega_0\tau_c \approx 1.12$, dając czas korelacji, τ_c , rzędu 3.55×10^{-10} s.

Proton naświe- tlany	Proton obserwowany / DPGF ROE (%)											
	7-H	12-H	11-H	14-H	17 ^a -H	17 ^b -H	5-CH ₂	23-CH ₂	N-Me ₂	18-CH ₂	19-CH ₃	OH-10
7-H							3.17 (1.2)	12.42 (6.3)	1.24			1.55 (-0.1)
12-H			5.91 (5.1)									
11-H		6.68 (5.1)										(0.6)
14-H										0.57 (0.2)	0.59 (0.2)	
17-H ^L						25.86 (21.5)						
17-H ^H					24.08 (21.5)					2.88 (2.2)		
5-CH ₂	2.48 (1.2)											
23-CH ₂	15.87 (6.3)								9.92 (0.1)			2.16 (1.4)
NMe ₂	0.3								1.88 (0.1)			(0.2)
18-CH ₂				0.9 (0.2)	0.56 (2.2)	3.06 (-0.3)					4.5 (0.2)	
19-CH ₃				0.49 (0.2)		0.17					2.51 (0.2)	

Tabela 8.3. Wartości DPGFSE ROE dla TPT x HCl rozpuszczonego w DMSO-*d*₆/CDCl₃ (4:2 v/v), próbka odgazowana, 30°C. W nawiasach podano teoretyczne wewnątrzcząsteczkowe wzmocnienia NOE. Protony 17-CH₂ dają układ AB, gdzie L oznacza proton przy niższej, a H proton przy wyższej częstotliwości, oba protony były naświetlane oddzielnie. Protony grup 5-CH₂ i 23-CH₂ dają silnie sprzężony układ AB i były naświetlane jednocześnie. Grupa NMe₂ wykazuje zahamowaną rotację, oba sygnały naświetlano jednocześnie.¹⁸⁶

Dla próbki odniesienia, tj. TPT w CDCl₃/DMSO-*d*₆ (4:2 v/v), efekt „steady state” NOE nie jest obserwowany w temperaturze pokojowej. Eksperyment DPGFSE ROE (tabela 8.3) pokazuje oczekiwane efekty wewnątrzcząsteczkowe, nie są natomiast widoczne efekty międzycząsteczkowe. Dla porównania w nawiasach podano teoretyczne wewnątrzcząsteczkowe wzmocnienia NOE. Zostały one obliczone z wykorzystaniem geometrii i odległości między protonami za pomocą opracowanego wcześniej protokołu.¹⁸⁷ Do obliczeń użyto programu

BUILDUP,^{188, 189} wykorzystując najniższą energię geometrii otrzymaną z obliczeń DFT (B3LYP 6-31G). Do obliczeń NOE zastosowano czas korelacji $\tau_c = 1.0 \times 10^{-10}$ s i współczynnik relaksacji zewnętrznej = 0.5 s^{-1} . Te wartości odzwierciedlają hipotetyczną niską lepkość medium, co pozwala osiągnąć reżim małych cząsteczek, charakteryzowany przez dodatnie wartości NOE.

W tabeli 8.4 porównano przesunięcia chemiczne chlorowodoru TPT w wodzie i w $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ (4:2 v/v). Mimo różnicy stałej dielektrycznej obu rozpuszczalników, zmiana przesunięć chemicznych jest nieznaczna. Niespodziewanie, przesunięcia chemiczne chlorowodoru TPT okazują się być niewrażliwe na zmianę stężenia czy rozpuszczalnika.

Przypisanie	dane z eksperymentu $^1\text{H NMR}$	
	DMSO- d_6 /CDCl $_3$	D $_2$ O
20-OH	11.09	c)
10-OH	10.35	c)
7-H	8.96	8.66 (s)
12-H	8.07 (d, 1H, $^3J=9$)	8.01 (d, 1H, $^3J=9.5$)
11-H	7.63 (d, 1H, $^3J=9$)	7.52 (d, 1H, $^3J=9.5$)
14-H	7.43 (s, 1H)	7.43 (s)
17-CH $_2^L$	5.50 (d, 1H, $^2J=16.2$, 1/2 układu AB)	5.52 (d, 1H, $^2J=15.5$, 1/2 układu AB)
17-CH $_2^H$	5.23 (d, 1H, $^2J=16.2$, 1/2 układu AB)	5.39 (d, 1H, $^2J=15.5$, 1/2 układu AB)
5-CH $_2$	5.23 (bs, układ AB)	5.15 (bd, 2H, układ AB)
23-CH $_2$	4.72	4.67 (układ AB) ^{e)}
NMe $_2$	2.84 (bd) ^{d)}	2.90 (bs, 6H)
18-CH $_2$	1.85 (m, 2H, część AB układu ABM $_3$)	1.97 (q, 2H, $^3J=7.0$)
19-CH $_3$	0.92 (t, 3H, $^3J=7.7$)	0.96 (t, 3H, $^3J=7.0$)

Tabela 8.4. Porównanie przesunięć chemicznych chlorowodoru TPT w formie laktonu (ppm) oraz stałych sprzężenia (Hz) w roztworze DMSO- d_6 /CDCl $_3$ (1mM)^{a)} i buforze D $_2$ O^{b)} w 30°C.

- DMSO- d_6 /CDCl $_3$ (2:4 v/v), widmo skalibrowane na wzorec wewnętrzny - DMSO- d_6 , $\delta = 2.49$ ppm;
- 0.415 mg/0.7 mL D $_2$ O, 38 mM NaCl, 38 mM K $_3$ PO $_4$, pH=5.1, TSP- d_4 jako wzorec wewnętrzny;
- wymiana z D $_2$ O;
- zahamowana rotacja;
- częściowo pokrywa się z H $_2$ O.

Powyższe eksperymenty wskazują na agregację TPT w buforach wodnych w temperaturach pokojowych. Wolne ruchy molekularne mocno solwatowanej cząsteczki monomerycznej, mimo że możliwe teoretycznie, są mniej prawdopodobne w przypadku struktury o małej masie cząsteczkowej (MW = 421). Obserwowane efekty dalekiego zasięgu, jak na przykład od 11-H do 18-CH $_2$ (tabela 8.2), zinterpretowane jako oddziaływanie międzycząsteczkowe, mogą być artefaktami dyfuzji spinowej. Jest to jednak mało prawdopodobne, ze względu na fakt, że obie

grupy w cząsteczce leżą daleko od siebie i nie ma między nimi żadnego protonu, który mógłby ułatwić dyfuzję.

Jeśli chodzi o problem agregacji, wcześniejsze prace przytaczają stałą autoasocjacji dla irinotekanu wynoszącą $2.41 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, dimery pojawiają się w wodzie przy stężeniu rzędu 2 mM (tak wynika z widma UV).¹⁹⁰ W pracy prof. Kozerskiego z różnicy przesunięć chemicznych TPT w zależności od stężenia uzyskano stałą autoasocjacji $K_a^{\text{TPT}} = 3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.⁸³ W tabeli 8.5 przedstawiono temperaturową zależność przesunięć chemicznych TPT, którą uzyskano na podstawie eksperymentu DNMR. Stała autoasocjacji uzyskana w tym eksperymencie wyniosła $K_a^{\text{TPT}} = 3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Eksperymenty DNMR wykonano w 0.94 mM roztworze TPT x HCl w fosforanowym buforze wodnym, przy pH = 5.1. Przesunięcia chemiczne skalibrowano wykorzystując sygnał TSP- d_4 . Widma zostały zarejestrowane w 3°, 15°, 30°, 45°, 60° i 80° C. Zmiany obserwowane dla protonów aromatycznych i pozostałych, gradienty temperaturowe (ppm/°C) i wartości graniczne przesunięć chemicznych dla monomeru i dimeru, δ_M and δ_D , podano w tabeli 8.5. Te ostatnie wartości zostały spisane z widm w, odpowiednio, wysokiej i niskiej temperaturze.

Wartości K_a dla TPT podane w tabeli 8.5 zgadzają się z wartościami podanymi przez zespół prof. Kozerskiego, otrzymanymi na podstawie eksperymentów rozcieńczania. Przy stężeniu 1mM w temperaturze 30°C w buforowanych roztworach wodnych, topotekan występuje jako monomer tylko w 40%. Co więcej, została oszacowana temperaturowa zależność wartości K_a , która w 3°C mieści się w przedziale 5-15 mM⁻¹, a ilość monomeru spada w tej temperaturze do ok. 10%.

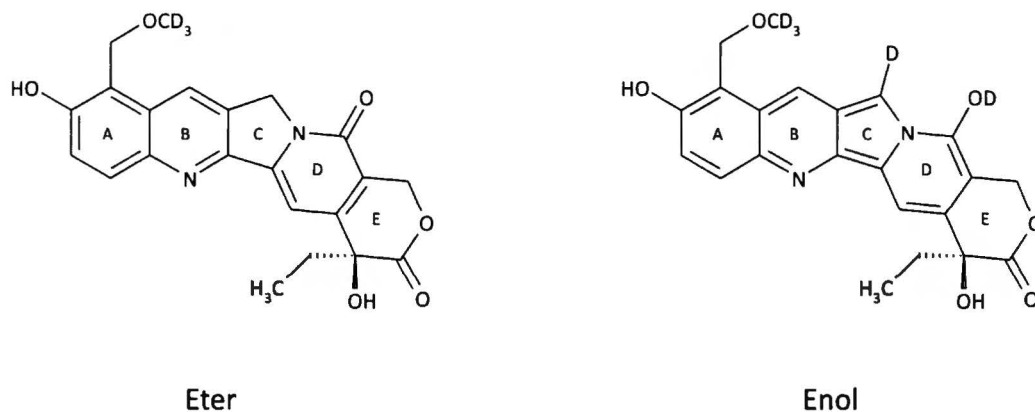
Proton	$\delta_M(\text{ppm})^a)$	$\delta_D(\text{ppm})^a)$	Temp. coeff. [ppb/°C]	$\delta_{\text{obs}}(80^\circ\text{C})$ ppm	$\delta_{\text{obs}}(3^\circ\text{C})$ ppm	$K_a^b)[\text{M}^{-1}] \times 10^3$
H-7	8.88	8.56	1.05	8.71	8.64	4.9
H-12	8.23	7.78	3.69	8.15	7.87	1.9
H-11	7.72	7.42	2.24	7.62	7.45	4.5
H-14	7.72	7.22	3.54	7.58	7.31	2.8
H-17 ^L	5.69	5.36	2.06	5.61	5.45	1.6
H-17 ^H	5.50	5.30	1.1	5.43	5.35	2.1

Tabela 8.5. Dane do oszacowania stałej autoasocjacji TPT, K_a , w 30 °C; DNMR w buforze wodnym przy pH 5.1. Protony 17-CH₂ dają układ AB, gdzie L oznacza proton przy niższej, a H proton przy wyższej częstotliwości.

- Wartości teoretyczne przesunięć dla monomeru i dimeru, odpowiednio δ_M and δ_D , otrzymano poprzez iteracyjne dopasowanie zależności przesunięć chemicznych od stężenia z użyciem 10 punktów eksperymentalnych;
- Wartości obliczone w 30°C, w oparciu o wartości teoretyczne δ_M i δ_D , z użyciem jednego punktu.

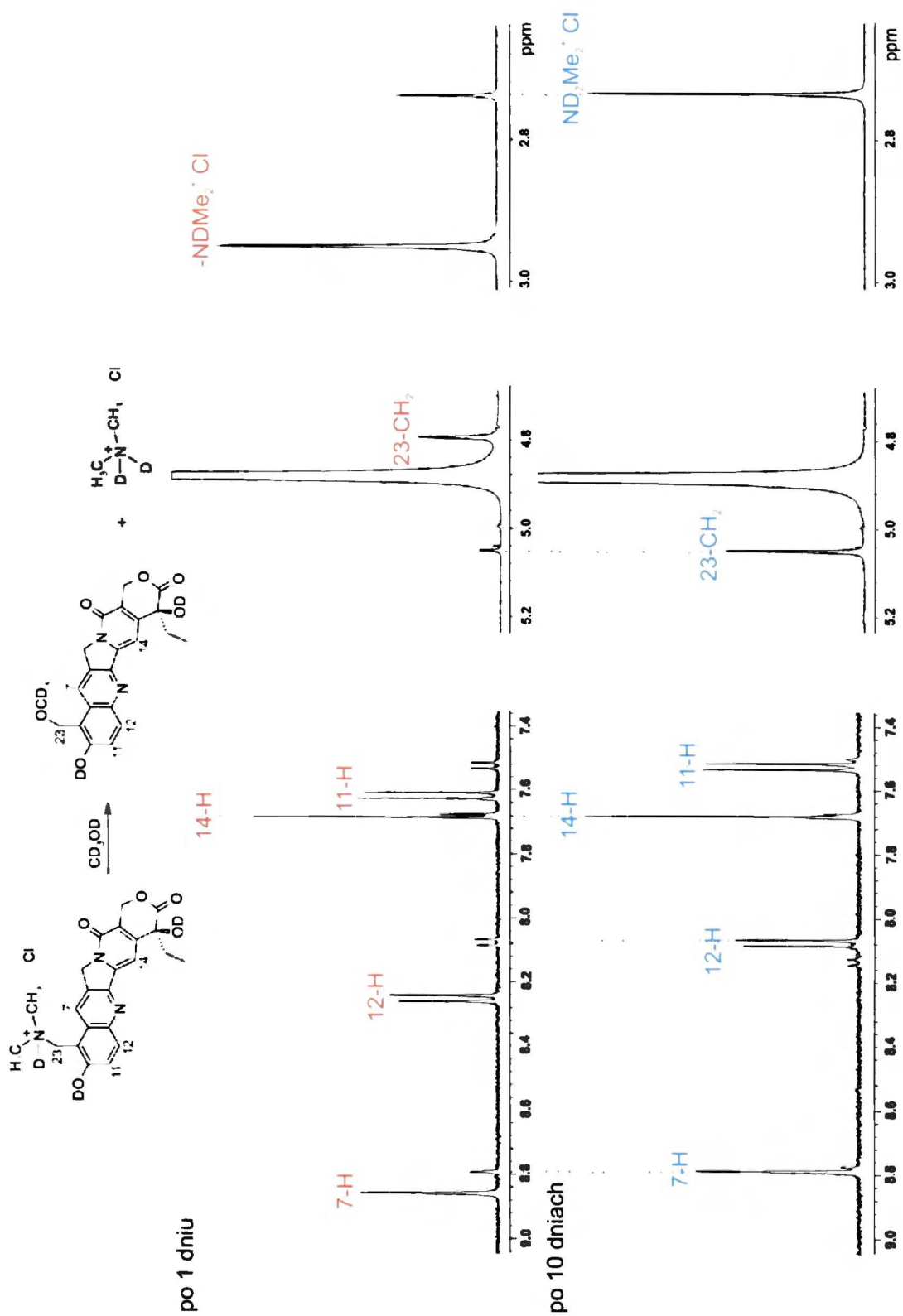
8.2. Równowaga i stabilność topotekanu w H₂O, MeOH i DMSO

Chlorowodorek TPT w roztworze CD₃OD ulega dwóm przemianom w temperaturze pokojowej, które mają różny przebieg czasowy. Pierwsza z nich to eliminacja grupy -NHMe₂⁺Cl⁻, prowadząca do utworzenia eteru 23-CH₂-OCD₃ (rysunek 8.1), druga to deuterowanie grupy 5-CH₂, które przebiega przez enolowy związek przejściowy (rysunek 8.1).



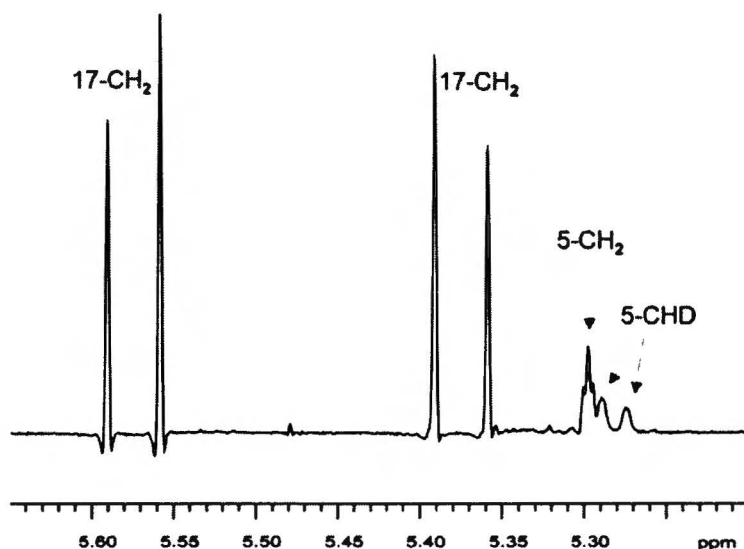
Rysunek 8.1. Eter TPT jego forma enolowa.

Proces eliminacji grupy -NHMe₂⁺Cl⁻, który jest zakończony po około 10 dniach, jest widoczny na widmie ¹H NMR (rysunek 8.2). Dowodem jest zniknięcie sygnału grupy 23-CH₂-N przy 4.78 ppm i pojawienie się sygnału grupy 23-CH₂-O przy 5.01 ppm. Kolejnym dowodem jest zniknięcie grupy -NDMe₂⁺Cl⁻ i pojawienie się sygnału odpowiadającego ND₂Me₂⁺Cl⁻ przy 2.72 ppm. Potwierdzeniem tego procesu jest również duża wartość δ dla jąder ¹³C i ¹H w grupie 23-¹³C¹H₂, w porównaniu z wyjściowym chlorowodorkiem TPT (tabela 8.6). Na podstawie tabeli przesunięć chemicznych można wywnioskować, że eter TPT jest w formie laktonowej (porównanie przesunięć 21-C=O i brak nierównocенności w grupie 18-CH₂, charakterystycznej dla karboksylanu). Na dolnym widmie pokazanym na rysunku 8.1 widoczny jest również drugi zestaw sygnałów, który został wstępnie przypisany do karboksylanu i nie może być dokładnie scharakteryzowany ze względu na niskie stężenie tej formy.



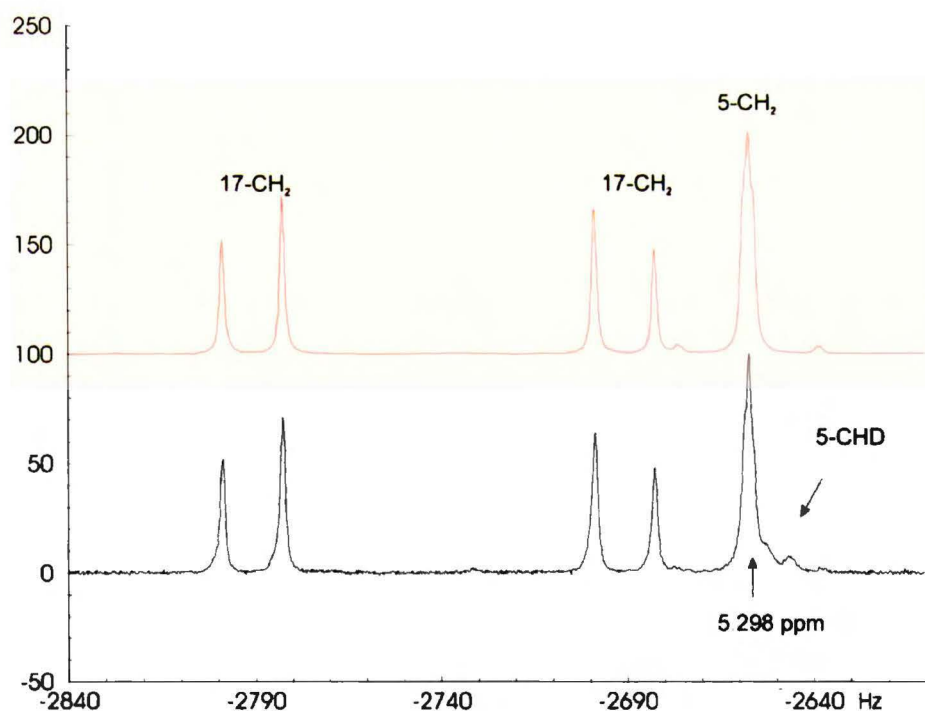
Rysunek 8.2. Eliminacja $\text{-NDMe}_2^+ \text{Cl}$ z chlorowodoru TPT w CD_3OD . Obecność grupy -OCD_3 jest udowodniona eksperymentalnie.

Grupa Sanny,^{125, 191} postulowała wcześniej tautomerię amid – enaminoenol w pierścieniu C/D topotekanu w pH < 4 w założeniach obliczeń teoretycznych, ale nie zostało to nigdy potwierdzone eksperymentalnie. W przypadku chlorowodoru TPT w roztworze metanolu- d_4 przechowywanego przez kilka miesięcy, udało mi się zaobserwować proces stopniowego zaniku sygnału grupy 5-CH₂ w wyniku deuterowania. Po kilku miesiącach wymiana ta jest prawie całkowita (*vide* rysunek 8.3). Może to być interpretowane jako rezultat obecności tautomeru typu enolowego (rysunek 8.1). Jest on obecny jedynie jako związek przejściowy, prawdopodobnie ze względu na wyższą energię w porównaniu z wyjściowym amidem. Kinetyka tego procesu jest bardzo wolna. Oba procesy (eliminacja grupy -NHMe₂⁺ Cl⁻ i deuterowanie grupy 5-CH₂ nie są obserwowane w roztworze D₂O, przy pH ≈ 6.



Rysunek 8.3. Fragment widma ¹H NMR chlorowodoru TPT x HCl w CD₃OD po kilku miesiącach.

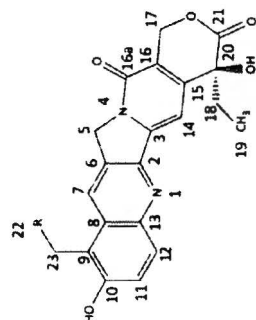
Na rysunku 8.3 pokazano fragment widma dokumentującego proces deuterowania grupy 5-CH₂ poprzez enolowy związek przejściowy. Tryplet przy 5.3 ppm jest resztkowym sygnałem niezdeuterowanej grupy 5-CH₂, scharakteryzowanej przez ²J_{gem} = -18 Hz, Δν_{gem} = 8 Hz oraz stałą dalekiego zasięgu do 7-H i 12-H, 0.9 Hz. Dwa szerokie sygnały przy niższych częstotliwościach to stereoselektywnie monodeuterowane sygnały 5-CHD, każdy scharakteryzowany przez zredukowaną stałą sprzężenia ²J_{gem} / 6.52 Hz, sprzężenie z kwadrupolem deuterowym i stałą sprzężenia dalekiego zasięgu do H-7. Symulację całego systemu spinowego 5-CH₂, 7-H, 11-H, 12-H tej części widma pokazano na rysunku 8.4.



Rysunek 8.4. Fragment widma ^1H NMR topotekanu (500 MHz), eksperymentalnego – na dole i symulacji – na górze, w CD_3OD , pokazujący deuterowanie grupy 5-CH_2 w eterze topotekanu $23\text{-CH}_2\text{OCD}_3$. Poszerzenie dwóch sygnałów o niższej częstotliwości przy 5.298 ppm jest wynikiem stereospecyficznego deuterowania każdego z protonów grupy 5-CH_2 .

Podczas próby oczyszczania chlorowodoru TPT na preparatywnej płytce TLC z żelem krzemionkowym w układzie octan etylu/metanol (4:1 *vol.*) zaobserwowano, że eliminacja grupy $\text{-NHMe}_2^+\text{Cl}^-$ z chlorowodoru TPT w metanolu- d_4 , opisana powyżej, przebiega natychmiastowo. Obecność krzemionki musi w jakiś sposób katalizować reakcję eliminacji, co skutkuje otrzymaniem pochodnej eterowej TPT, $23\text{-CH}_2\text{OCH}_3$. Z tego powodu, chlorowodorek TPT nie może być oczyszczany na żelu krzemionkowym.

Badane formy i pochodne TPT scharakteryzowano w tabeli 8.6 za pomocą przesunięć chemicznych ^1H i ^{13}C NMR.



	TPT x HCl lakton D ₂ O, pH 6	TPT x HCl karboksylan D ₂ O, pH 10	TPT obojętny DMSO-d ₆	TPT eter 23-CH ₂ OCH ₃ CD ₃ OD	TPT lakton DMSO-d ₆	TPT karboksylan DMSO-d ₆	TPT alkohol DMSO-d ₆
2-C	150.8	148.5	149.0	147.3	150.2	149.6	149.5
3-C	147.9	146.9	146.1	148.4	146.1	146.6	146.4
5-H ₂ C	5.20; 53.4	5.04; 53.4	5.25; 50.3	5.23; 51.3	5.28, 50.6	5.26, 50.7	5.25; 50.8
6-C	133.0	n.o.	129.8	n.o.	131.2	130.3	130.1
7-HC	8.65; 128.5	8.25; 126.0	8.71; 126.1	8.52; 127.0	8.91, 126.8	8.75, 127.7	8.75; 127.9
8-C	131.5	132.4	128.7	132.3	n.o.	129.5	129.6
9-C	110.8	109.9	114.2	115.8	109.1	109.4	119.6
10-C	160.5	169.4	156.6	165.1	n.o.	n.o.	154.2
11-HC	7.47; 125.4	7.25; 131.1	7.43; 122.7	7.36; 128.9	7.64, 122.5	7.49, 123.0	7.48; 123.2
12-HC	7.94; 134.6	7.85; 133.3	7.98; 129.9	7.87; 130.8	8.19, 133.5	7.97, 130.5	7.96; 130.6
13-C	145.3	143.7	143.6	143.9	144.0	144.2	144.1
14-HC	7.37; 101.2	7.50; 103.5	7.26; 95.7	7.59; 98.3	7.29, 96.6	7.25, 96.2	7.25; 96.5
15-C	153.4	159.7	150.2	153.0	150.7	n.o.	150.6
16-C	120.9	129.0	118.2	118.5	119.2	119.0	118.6
16a-C(O)	n.o.*	165.2	157.0	159.5	157.5	n.o.	157.3
17-H ₂ C	5.37, 5.50 68.4	4.84 58.7	5.37, 5.57; 65.1	5.37, 5.57; 66.7	5.29, 5.42; 65.6	5.40, n.o.	5.39; 65.7
18-H ₂ C	1.96, 33.5	2.20, 2.38; 34.2	1.86; 30.1	1.96; 32.6	1.86; 30.7	1.38, 26.3	1.84; 30.7
19-H ₃ C	0.96; 9.6	1.07; 10.2	0.88; 7.7	1.01; 8.15	0.87, 8.2	0.82, n.o.	0.86; 8.3
20-C	76.2	82.2	72.5	74.3	73.0	n.o.	72.9
21-C(O)	177.4	181.1	172.6	175.1	173.1	n.o.	173.0
22-H ₃ C(N)	2.91; 45.1	2.85; 44.5	2.31; 44.5	-	2.84, 43.0	n.o.	-
23-H ₂ C	4.68; n.o.	4.51; 56.7	4.01; 54.5	4.98; 66.3	4.72, 51.0	4.95, 53.9	4.94; 54.2
inne	-	-	-	22-OCH ₃ 3.44; 57.8	-	-	-

Tabela 8.6. Przesunięcia ¹³C NMR [ppm], różnych form i pochodnych TPT w D₂O, metanolu-d₄ i DMSO-d₆, T_{pok}*,* not observed.

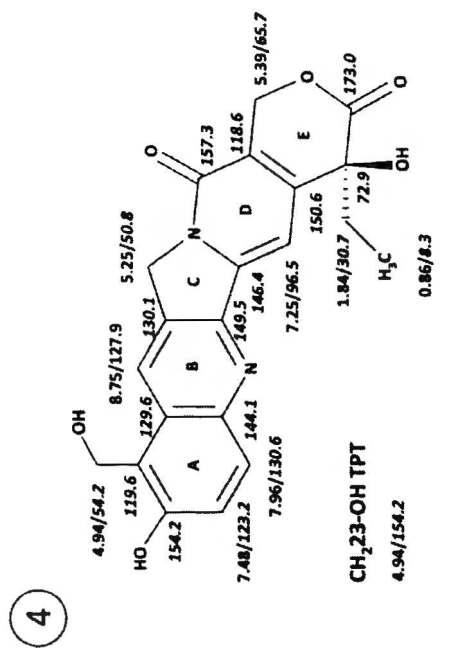
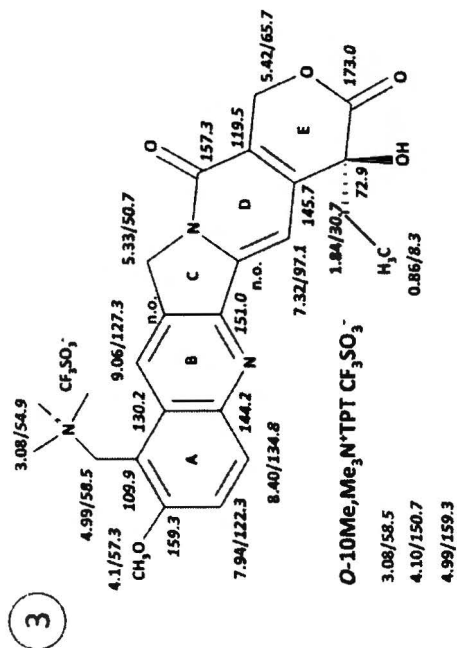
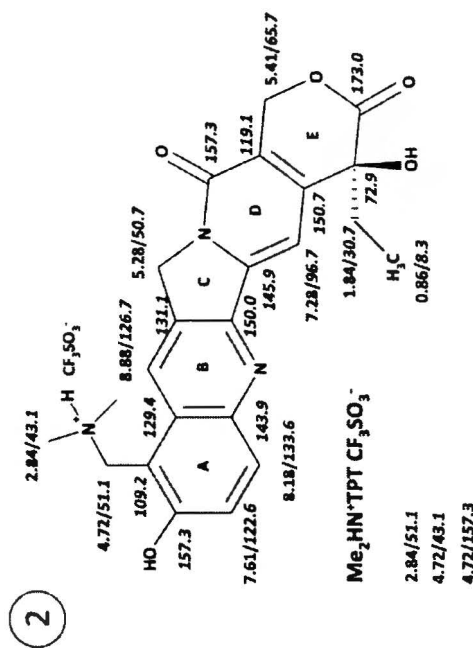
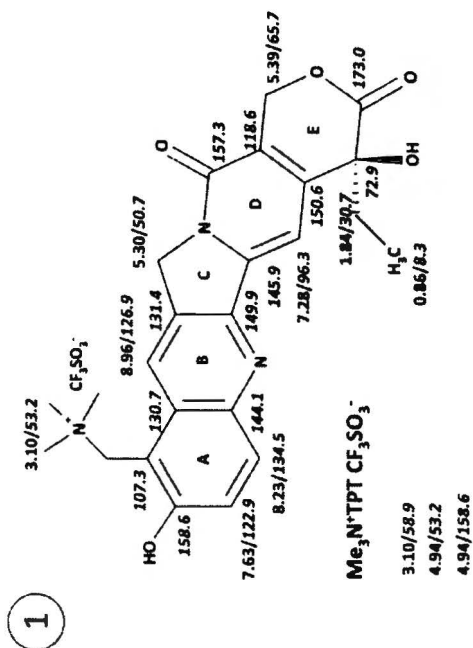
8.3. Synteza pochodnej topotekanu – reakcja czwartorzędowania

Modyfikacja struktury kamptotecyn była i jest przedmiotem badań wielu grup badawczych (*vide* część literaturowa). W ramach tej pracy podjęto próbę syntezy czwartorzędowej soli amoniowej przy użyciu $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$, $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ oraz CH_3I jako czynników alkilujących. Struktury produktów otrzymanych w reakcji z $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ wraz z ich przesunięciami chemicznymi, pokazano na rysunku 8.6. Każdej strukturze towarzyszą sygnały korelacyjne, które charakteryzują transfer polaryzacji w widmie HMBC od protonów grupy 23- CH_2 do atomu węgla w pierścieniu A, C-10.

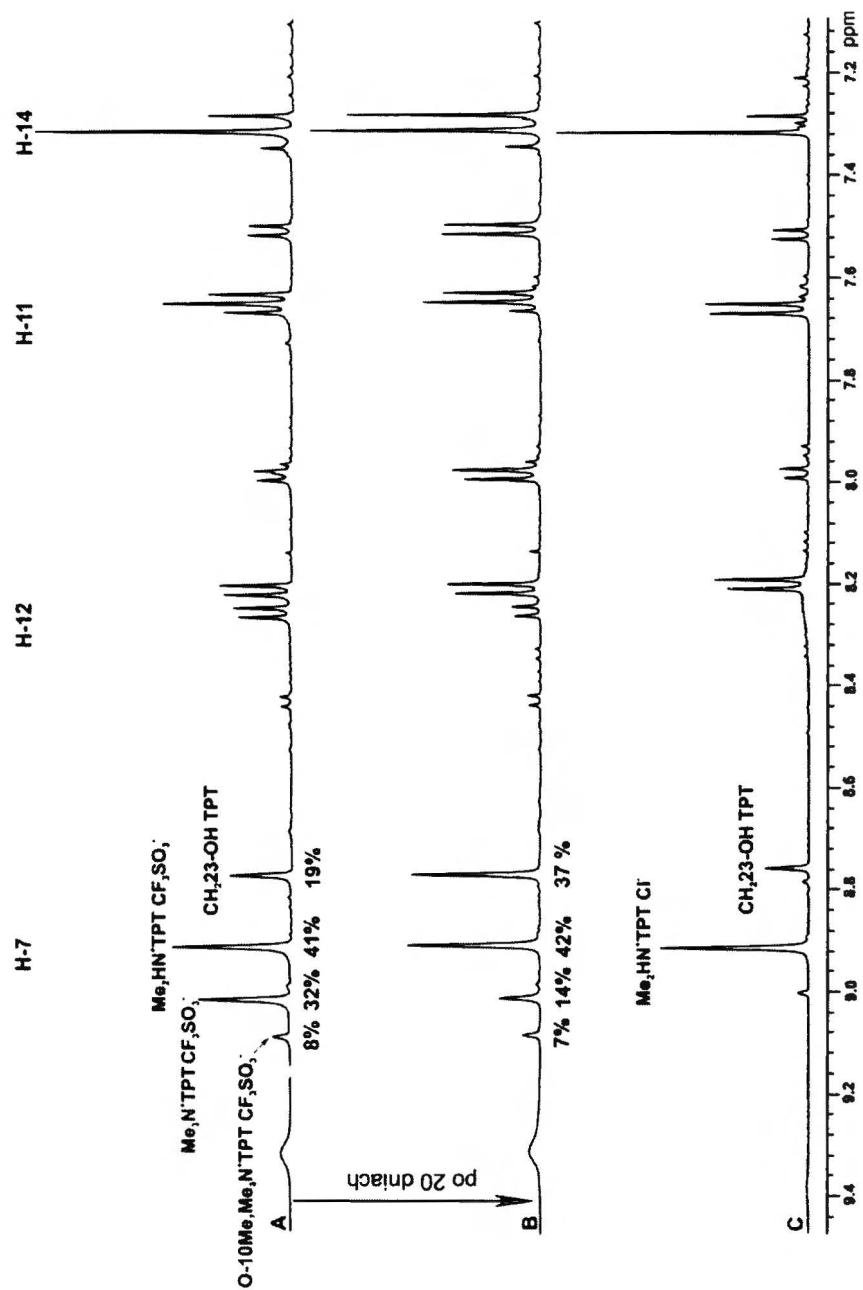
W przypadku stosowania $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ reakcja przebiega całkowicie, prowadząc do otrzymania maksymalnie 50% soli trimetyloamoniowej 1 na rysunku 8.5 (do opisu produktów stosowane będą akronimy charakteryzujące rodzaj zmian w pierścieniu A, np. $[\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ jest akronimem soli topotekanu zawierającej grupę trimetyloaminową z przeciwionem kwasu trifluorometanosulfonowego) oraz przynajmniej dwóch innych produktów, to jest produktu protonowania (2 na rysunku 8.5, $[\text{Me}_2\text{HN}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$) oraz produktu dimetylowania, *N*-23 i *O*-10 lub *O*-20 (3 na rysunku 8.5, $[\text{O}-10\text{Me}, \text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$). W niewielkiej ilości obecny jest też alkohol (4 na rysunku 8.5, $[\text{CH}_2\text{23-OH TPT}]$). Próba rozdzielenia mieszaniny produktów zakończyła się niepowodzeniem. Produkty w mieszaninie zostały scharakteryzowane za pomocą ESI MS, ^1H NMR, HSQCAD i GHMBC- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR w roztworze $\text{DMSO}-d_6$. Na rysunku 8.5 pokazano struktury produktów reakcji czwartorzędowania wraz z ich przesunięciami chemicznymi (^1H NMR oraz ^{13}C NMR). Produkty reakcji z $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ są analogiczne. Nie udało mi się otrzymać soli czwartorzędowej w reakcji z jodkiem metylu. W reakcji tej powstawała skomplikowana i niedająca się scharakteryzować mieszanina produktów. W tej sytuacji próbowałam otrzymać czwartorzędową pochodną etylową, tj. z wykorzystaniem $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$. Liczyłam, że ze względu na grupę etylową, łatwiej będzie zauważyć na widmie NMR ewentualny produkt alkilowania. Jednak reakcja to prowadziła również do bardzo skomplikowanej mieszaniny produktów.

Na rysunku 8.6 pokazano zakres przesunięć chemicznych protonów aromatycznych widma ^1H NMR, które zostało wykorzystane do przypisania sygnałów [pozostałe fragmenty widma widoczne są na rysunkach 8.7 (region 3.8 – 5.5 ppm) i 8.8 (region 0.3 – 3.3 ppm)]. Przypisanie struktur było możliwe z pomocą widma chlorowodoru TPT w $\text{DMSO}-d_6$, wykonanego po kilku miesiącach od rozpuszczenia próbki, na którym widoczny jest alkohol.

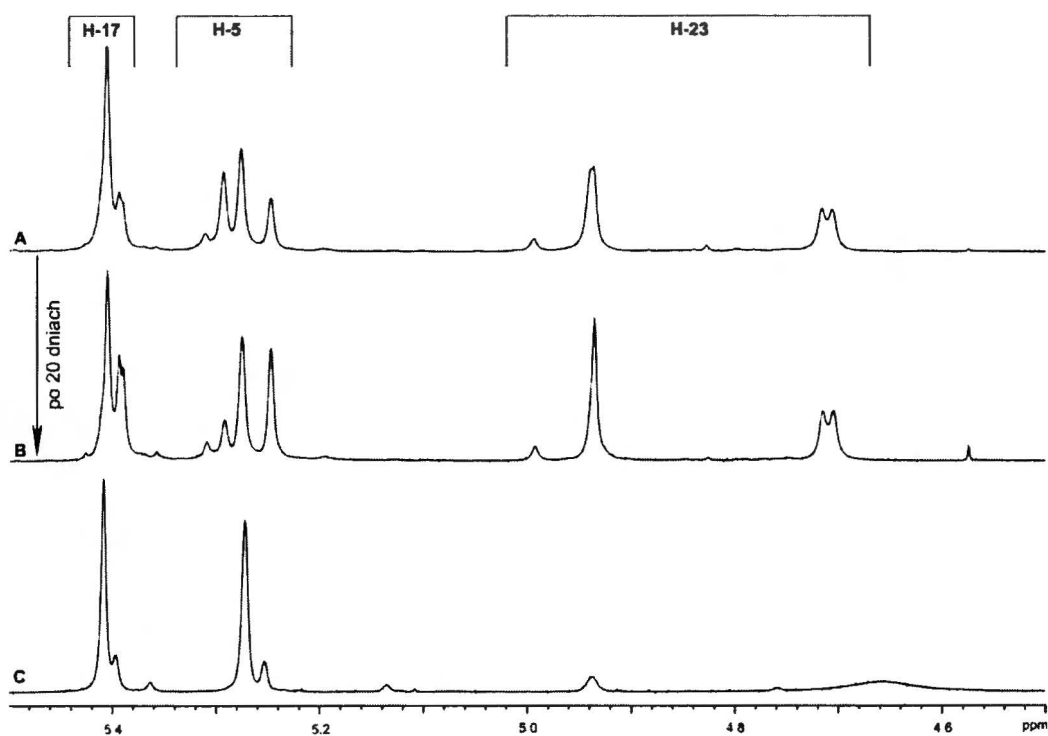
Potwierdzeniem struktury soli $[\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ i $[\text{O}-10\text{Me}, \text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ jest obecność sygnału grupy Me_3N^+ przy 3.12 ppm (rysunek 8.8) oraz przesunięcia chemiczne ^1H (rysunek 8.6) i ^{13}C NMR.



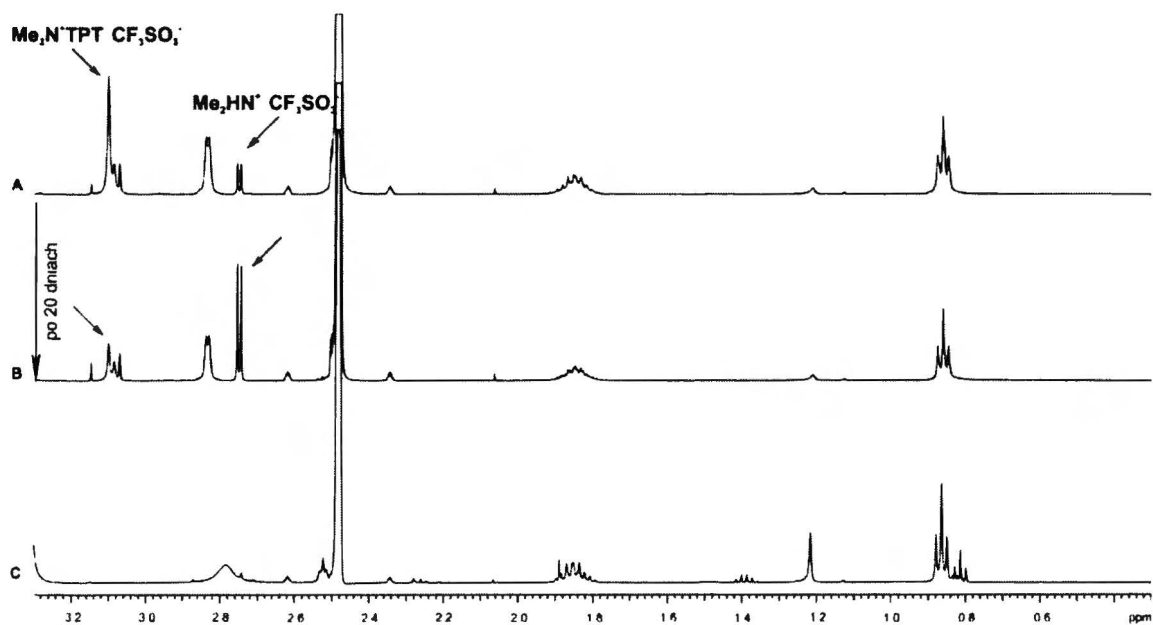
Rysunek 8.5. Struktury produktów otrzymanych w reakcji czwartorzędowania obojętnego TPT za pomocą CF₃SO₂OCH oraz przesunięcia wybranych sygnałów korelacyjnych w DMSO.



Rysunek 8.6. A. Aromatyczna część widma ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) mieszaniny produktów reakcji czwartorzędowania obojętnego TPT za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$. B. Ta sama mieszanina 20 dni później. C. Widmo TPT x HCl w $\text{DMSO-}d_6$ miesiąc po rozpuszczeniu, pokazane dla porównania. Sygnały opisano akronimami charakterystycznymi rodzaj zmian w pierścieniu A.



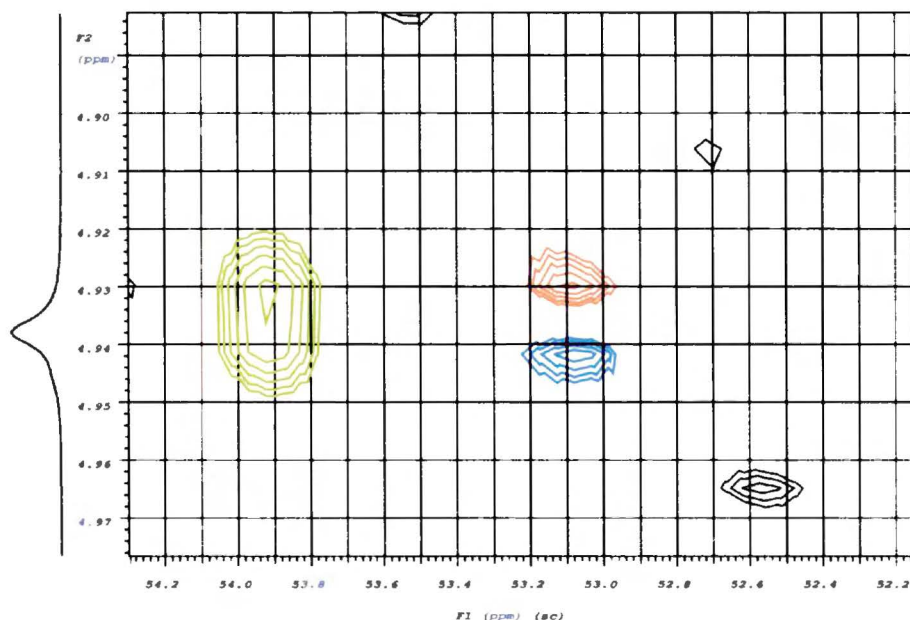
Rysunek 8.7. A. Fragment widma ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) mieszaniny produktów reakcji czwartorzędowania obojętnego TPT za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$. B. Ta sama mieszanina 20 dni później. C. Widmo TPT x HCl w $\text{DMSO-}d_6$ miesiąc po rozpuszczeniu, pokazane dla porównania.



Rysunek 8.8. A. Alifatyczna część widma ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) mieszaniny produktów reakcji czwartorzędowania obojętnego TPT za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$. B. Ta sama mieszanina 20 dni później. C. Widmo TPT x HCl w $\text{DMSO-}d_6$ miesiąc po rozpuszczeniu, pokazane dla porównania. Sygnały opisano akronimami charakteryzującymi rodzaj zmian w pierścieniu A.

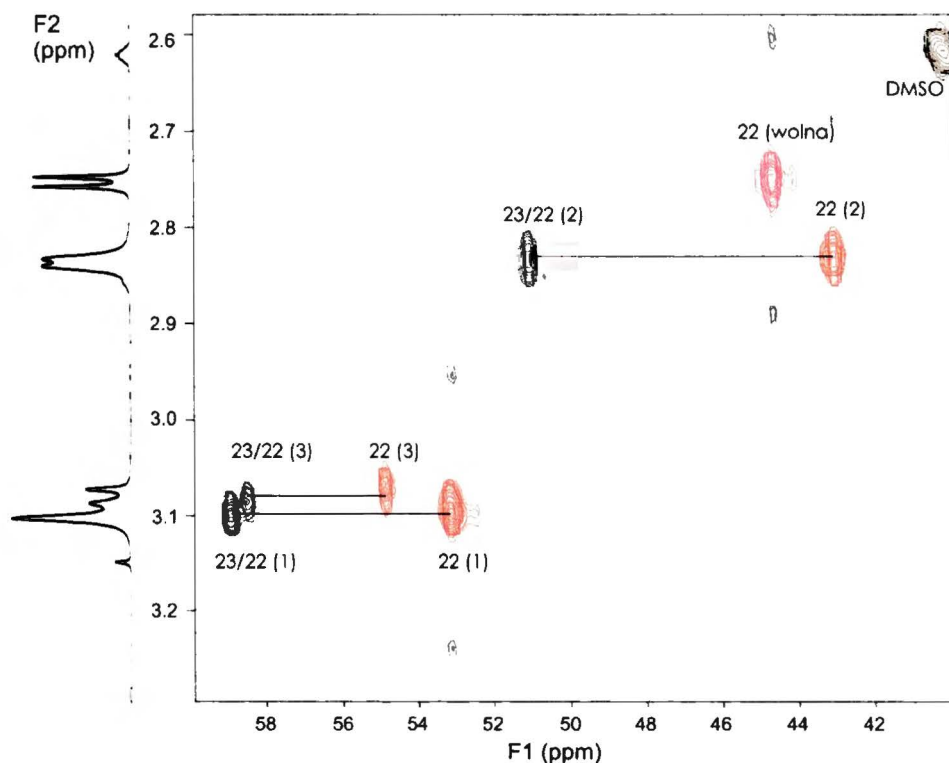
Okazało się, że produkt N-metylowania (1) jest nietrwały i pozostawiony w DMSO- d_6 ulega substytucji grupy Me_3N^+ dając alkohol [$\text{CH}_2\text{23-OH TPT}$] (4) oraz wolną sól [$\text{Me}_3\text{HN}^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$] (rysunek 8.8, dublet przy 2.73 ppm). Szybkość tego procesu można obserwować na widmie ^1H NMR (rysunek 8.6), które pokazuje zmianę wysokości sygnałów pochodzących od obu związków. Interesujący jest fakt, że sól [$\text{Me}_2\text{HN}^+\text{TPT} \text{CF}_3\text{SO}_3^-$] nie eliminuje tak łatwo grupy dimetyloaminowej Me_2HN^+ , co potwierdza znikoma ilość alkoholu na widmie C (rysunek 8.6), przedstawiającym chlorowodorek TPT w DMSO- d_6 po miesiącu od przygotowania próbek.

Na rysunku 8.9 widoczny jest sygnał korelacyjny $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC (oznaczony kolorem niebieskim i czerwonym) między grupą metylową w parze jonowej ($^{13}\text{CH}_3$) $_3\text{N}^+ \text{CH}_3\text{SO}_3^-$ (3.11/53.1 ppm i 3.05/45.5 ppm odpowiednio dla kationu i anionu) a grupą metylenową 23- C^1H_2 (53.9 ppm) obserwowaną w widmie ^1H przy 4.93 ppm. Grupę metylową (C^1H_3) $_3 \text{N}^+$ w soli trimetyloamoniowej (3.11 ppm) łatwo zidentyfikować za pomocą małej stałej sprzężenia do ^{14}N , $^2J(^1\text{H}, ^{14}\text{N})$ ca 2 Hz, obserwowanej zwykle w czwartorzędowych solach amoniowych ze względu na symetryczne otoczenie atomu azotu.



Rysunek 8.9. Nałożony fragment widma fazoczułego $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC (czerwono-niebieskie) i widma „absolute value” $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQCAD (zielone) czwartorzędowej soli TPT w DMSO- d_6 (reakcja czwartorzędowania za pomocą $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$).

Na rysunku 8.10 pokazano fragment widma $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, potwierdzający strukturę otrzymanych produktów reakcji czwartorzędowania.



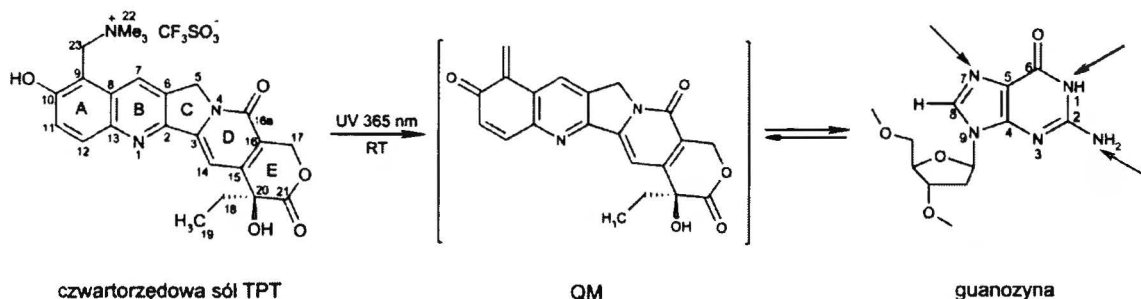
Rysunek 8.10. Nałożone alifatyczne części widm $^1\text{H}/\text{HSQC}/\text{HMBC}$ NMR (kolorowe/czarne) mieszaniny produktów reakcji czwartorzędowania obojętnego TPT za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ (cyfry w nawiasach odpowiadają numeracji produktów na rysunku 8.5). Kolorowe sygnały HSQC połączono z czarnymi sygnałami HMBC – jest to dowód przyłączenia odpowiedniej grupy metylowej do 23-CH_2 . Różowy sygnał HSQC odpowiada wolnej soli $[\text{Me}_3\text{HN}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ i nie ma sygnałów korelacyjnych.

Otrzymane dane potwierdzające strukturę produktów reakcji czwartorzędowania TPT nie są zgodne z wynikami otrzymanymi przez grupę Hechta, tj. przesunięciem grupy Me_3N^+ przy 2.94 ppm, a CH_3SO_3^- przy 2.78 dla tego samego związku w układzie metanol/ CDCl_3 (proporcji nie podano).¹⁰⁴ W pracy tej nie podano przesunięć ^{13}C . Nasze doświadczenie wskazuje, że czwartorzędowa sól amoniowa nie jest stabilna w metanolu.

8.4. Oddziaływania pochodnej topotekanu z DNA

Gdyby podstawnik w pozycji 23-C topotekanu mógł ulegać eliminacji, prowadziłoby to do powstania związku przejściowego typu „*o*-quinone methide” (QM), który z kolei mógłby kowalencyjnie wiązać się z DNA. Taki mechanizm był już postulowany w literaturze bez udziału promieniowania UV.¹⁹² Jak wspomniano w części literaturowej, powstawanie reaktywnych

związków przejściowych QM jest powodowane przez utlenianie lub naświetlanie światłem UV. Dane dotyczące fotochemicznych transformacji, którym ulegają kamptotecyny, są ograniczone.¹⁹³ Zakładaliśmy, że pierścień A topotekanu może ulegać fotochemicznie wzbudzonej przemianie do przejściowego związku typu QM, który następnie mógłby *in situ* reagować z nukleofilowymi centrami guaniny w duplesie DNA. Powinno to przebiegać tym łatwiej, że TPT przyłącza się do krańcowej pary GC, jak pokazano wcześniej w tym laboratorium dla naturalnego oligomeru d(GCGATCGC)₂,⁸³ oraz do pary GC wewnątrz przerwy w rozciągniętym dekamerze DNA.⁹ Nasze wcześniejsze doświadczenia pokazały, że chlorowodurek TPT ulega fotochemicznej transformacji w buforze wodnym w pH 6 w czasie długotrwałego (10 h) naświetlania światłem UV ($\lambda = 365$ nm), prowadząc do otrzymania związku z grupą -OH na atomie 23-C, z niewielką wydajnością (ca 10%). Z drugiej strony, w mieszaninie nadmiaru chlorowodoru TPT z oligomerem d(GCGATCGC)₂ nie były widoczne produkty alkilowania lub uszkodzenia DNA podczas naświetlania, zarówno przy $\lambda = 365$, jak i 254 nm. Z tego powodu poszukiwaliśmy pochodnej, która miałaby lepiej odchodzącą grupę w pozycji 23-C, oraz była lepiej rozpuszczalna w wodzie od chlorowodoru TPT. Okazało się, że czwartorzędowa sól topotekanu (oznaczana dalej jako Me₃N⁺TPT CF₃SO₃⁻) spełnia oba te kryteria (rysunek 8.11) i została zastosowana do badania oddziaływań z DNA.

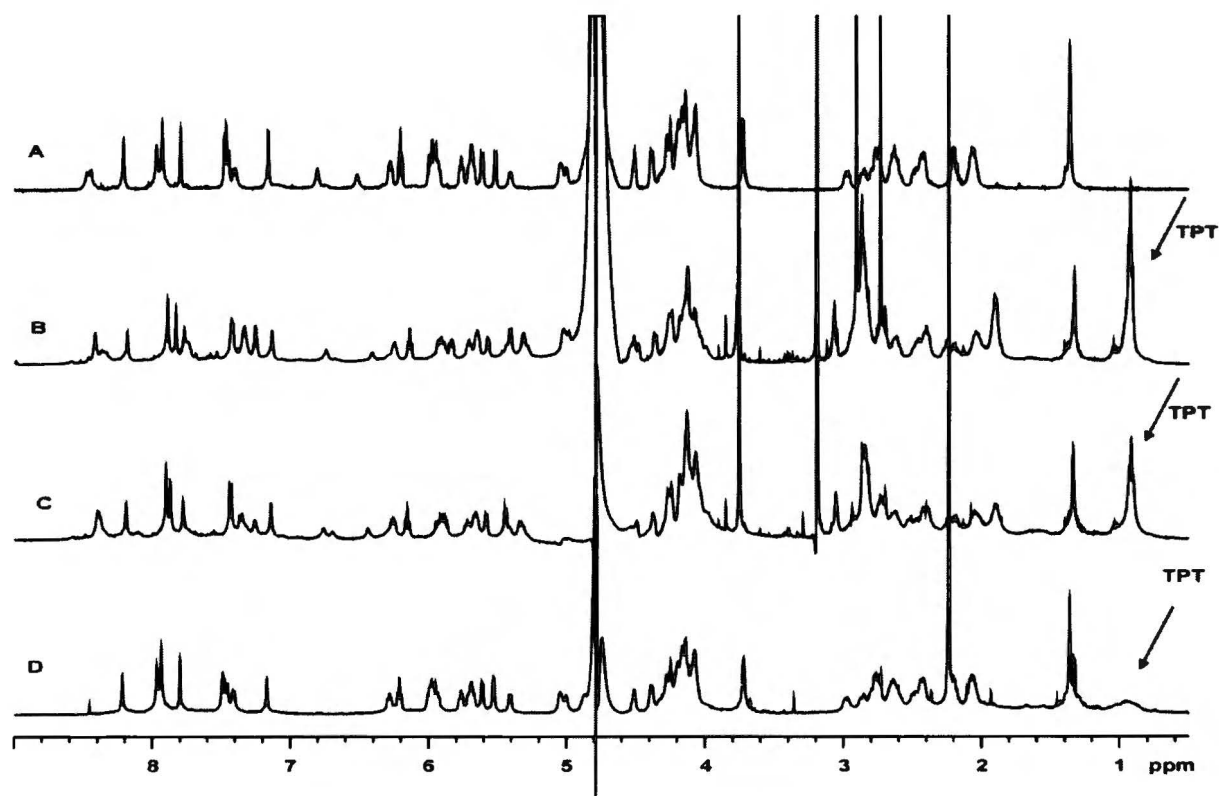


Rysunek 8.11. Schemat powstawania związku typu QM z czwartorzędowej soli TPT oraz możliwe miejsca alkilowania w guanozynie.

Ponieważ sól ta jest niestabilna w roztworach wodnych i w DMSO, stosowano ją w mieszaninie poreakcyjnej, po dokładnym usunięciu odczynnika alkilującego. Sądziłyśmy, że inne związki obecne w mieszaninie poreakcyjnej (*i.e.* [Me₂HN⁺TPT CF₃SO₃⁻], [O-10Me, Me₃N⁺TPT CF₃SO₃⁻], [CH₂23-OH TPT], *vide* rys. 8.5) nie będą kolidować, ponieważ nie mogą efektywnie dawać związku QM. Dla [Me₂HN⁺TPT CF₃SO₃⁻] zostało to sprawdzone eksperymentalnie, a dla pozostałych dwóch związków nie ma możliwości mechanizmu reakcji poprzez eliminację/addycję

(*via* QM), jakkolwiek możliwa jest bezpośrednia substytucja benzyłowego atomu węgla w zasadach azotowych.¹⁹⁴

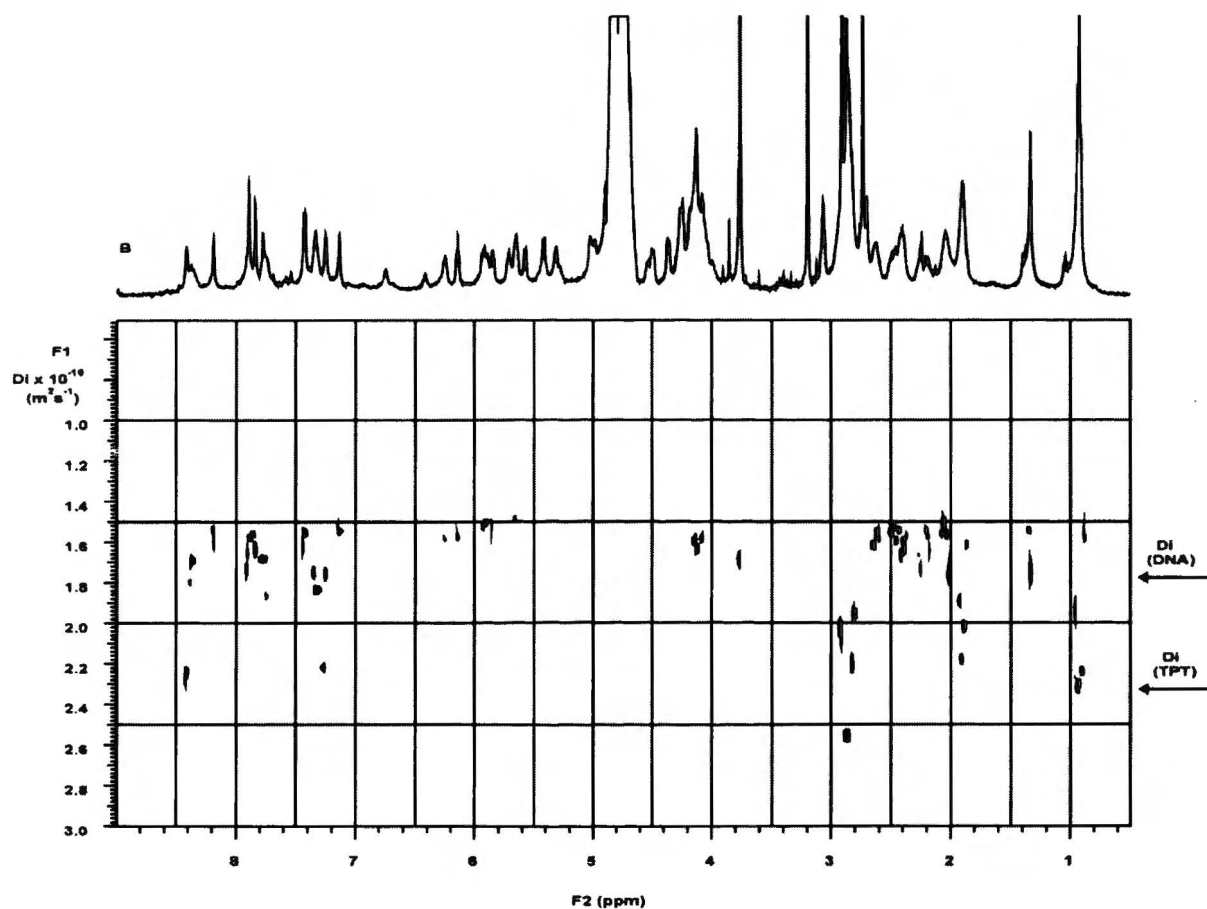
Dodatek pochodnej $[\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ do dupletu $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ powoduje zmiany przesunięć chemicznych niektórych sygnałów protonów w DNA (*vide* region sygnału protonów 1'-H na widmach A i B, rysunek 8.12), co świadczy o niekowalencyjnym oddziaływaniu fragmentu TPT z DNA. Dowód takiego oddziaływania chlorowodoru TPT zaprezentowano we wcześniejszej pracy prof. Kozerskiego.⁸³ Przy wartości 3.14 ppm na widmach B i C widoczny jest sygnał pochodzący od grupy Me_3N^+ przyłączonej do atomu węgla 23-C w pochodnej TPT, która ulega reakcji z DNA.



Rysunek 8.12. Monitorowany widmem ^1H NMR przebieg reakcji pochodnej $\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-$ (1.5 mM) z oligomerem $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ (1.0 mM) w buforze wodnym, pH 6; A – czyste DNA; B – DNA z $\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-$; C – jak w B, po 20 h naświetlania światłem UV przy 365 nm; D – jak w C, po usunięciu niezwiązanej pochodnej TPT.

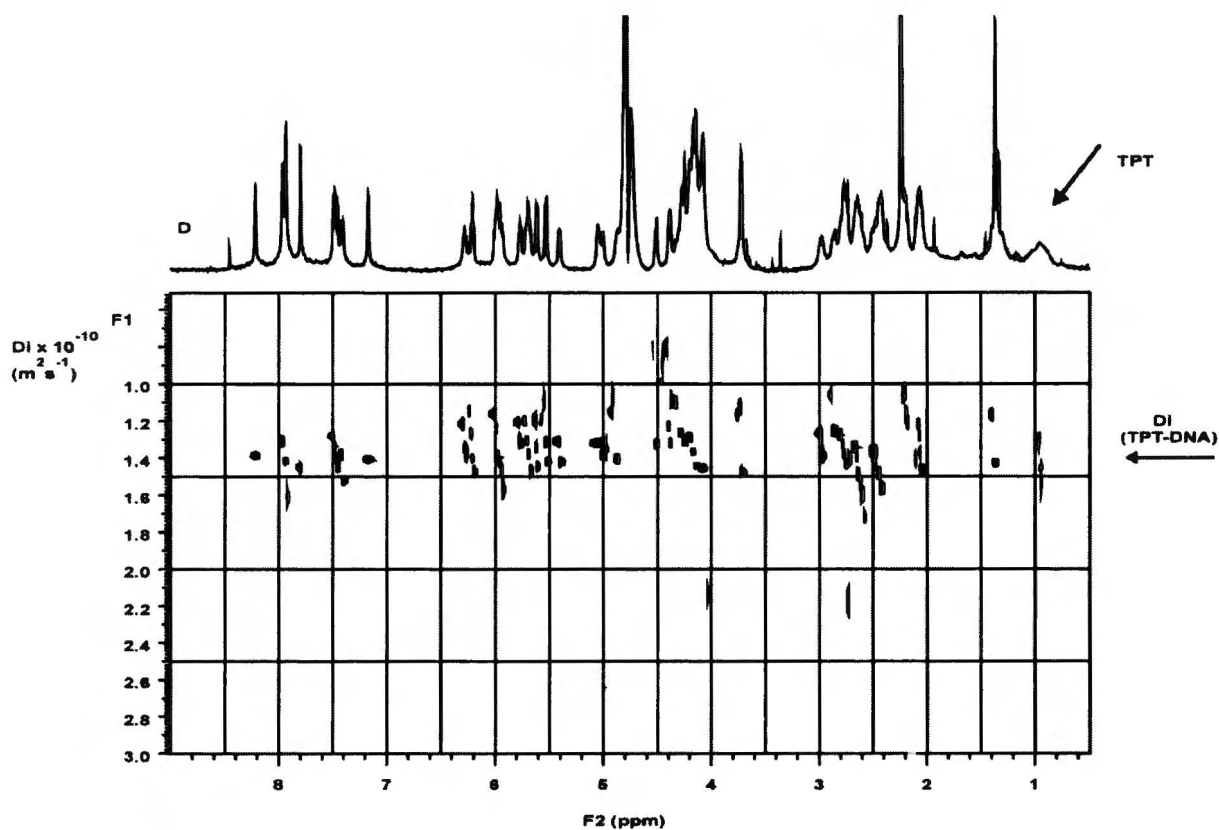
Eksperyment DOSY wykonany na tej próbce, pokazany na rysunku 8.13, pokazuje różne wartości współczynników dyfuzji dla pochodnej TPT i DNA, co wskazuje na szybką wymianę wolnego i związanego niekowalencyjnie $[\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-]$ z DNA. Widmo C wykonano dla tego

samego roztworu po 20h naświetlania światłem UV przy 365 nm. Zaznaczony sygnał pochodnej TPT (przy *ca* 1 ppm) reprezentuje nałożone sygnały protonów metylowych pochodzących od obu pochodnych TPT (przyłączonej kowalencyjnie oraz wolnej). Nadmiar niezwiązanej pochodnej TPT usunięto poprzez sączenie mieszaniny poreakcyjnej przez kolumnę HiTrap.



Rysunek 8.13. Eksperyment PFGSE na próbce B z rysunku 8.12. Strzałki wskazują współczynniki dyfuzji, D_i , DNA (z niekowalencyjnie związaną pochodną TPT), *ca* $1.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ oraz wolnej pochodnej TPT w szybkiej wymianie z DNA, $2.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

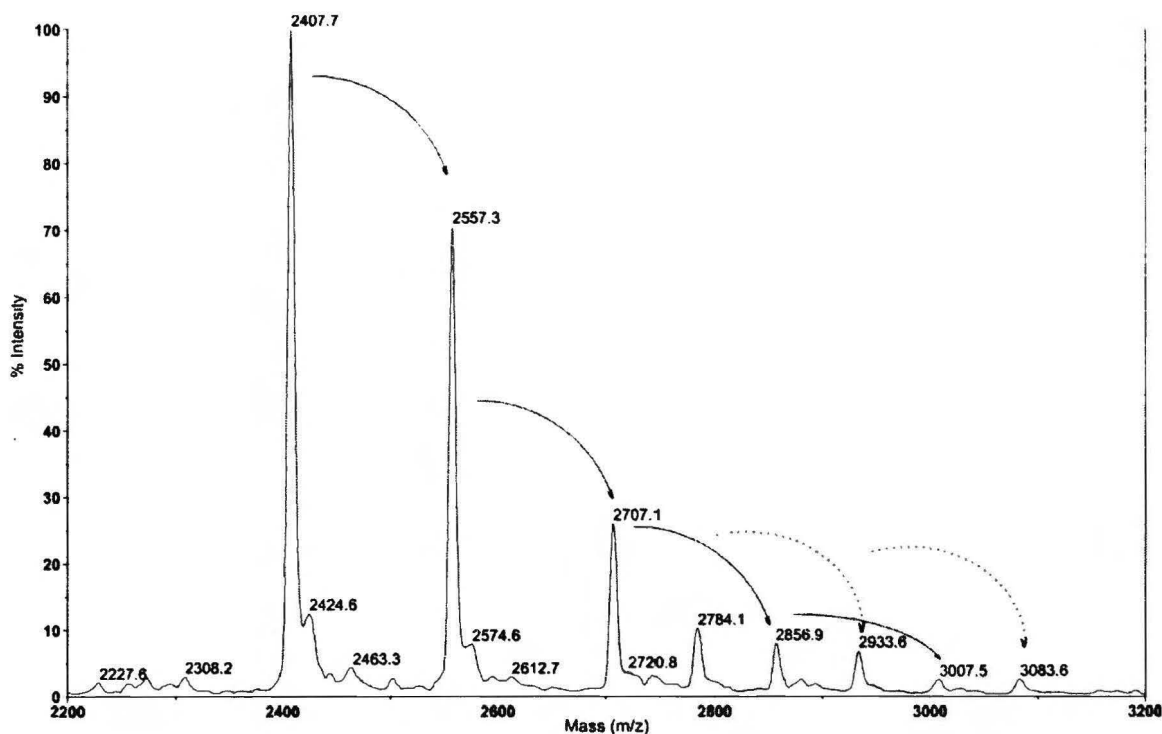
Widmo wymytego roztworu pokazano na widmie D (rysunek 8.12). Przy 1 ppm widoczny jest szeroki sygnał, wskazujący na obecność DNA przyłączonego do fragmentu pochodnej TPT. Jest to potwierdzone w eksperymencie DOSY (rysunek 8.14), na którym widoczny jest współczynnik dyfuzji, D_i , $1.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, wspólny dla fragmentu pochodnej TPT i DNA.



Rysunek 8.14. Eksperyment DOSY na próbce D z rysunku 8.12. Strzałki wskazują współczynnik dyfuzji biokoniugatu DNA - TPT, D_i , $\text{ca } 1.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

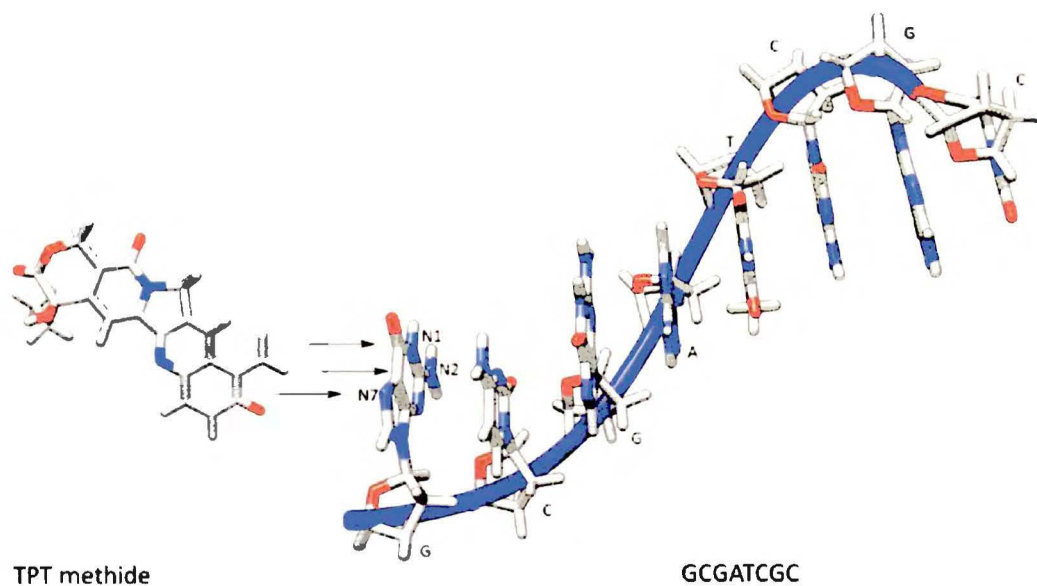
Sygnal protonów metylowych na rysunku 8.14 jest szeroki, wskazując na nakładanie się kilku sygnałów. Można to zinterpretować jako efekt alkilowania różnych atomów azotu pary GC. Opierając się na wcześniejszych badaniach przypuszczamy, że sól $\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-$ jest przyłączona do ostatniej pary GC i dlatego wywołane naświetlaniem UV przyłączenie może następować w bliskim sąsiedztwie (*i.e.* para GC). Z uwzględnieniem regiospecyficzności alkilowania różnych atomów azotu guaniny, Rokita i inni zaproponowali, że modelowy związek QM może przyłączać się do trzech atomów: N1, N2 i N7 guanozyny, ale nieznacznie bardziej preferowane jest alkilowanie atomu N1.¹⁹⁵ Z drugiej strony, reakcja ta może być odwracalna i po powstaniu kontrolowanego kinetycznie adduktu z mocnym nukleofilem (np. N7 guanozyny) może prowadzić do utworzenia stabilniejszego termodynamicznie adduktu ze słabszym nukleofilem (np. N2 guanozyny).⁶⁵ Nie oczekiwaliśmy więc regioselektywności, a szeroki sygnał pochodzący od protonów metylowych jest tego potwierdzeniem. Wcześniejsze prace wskazują również, że chlorowodorek TPT oddziałuje niekwalencyjnie z DNA w kilku konformacjach,⁸³ co dodatkowo tłumaczy brak regioselektywności alkilowania.

Wyniki NMR są potwierdzone widmami mas przy zastosowaniu techniki MALDI. Na rysunkach 8.15 i 8.17 widoczne jest widmo MALDI próbki scharakteryzowanej wcześniej doświadczeniami ^1H NMR i PFGSE (widmo D, rysunek 8.12 oraz rysunek 8.14).

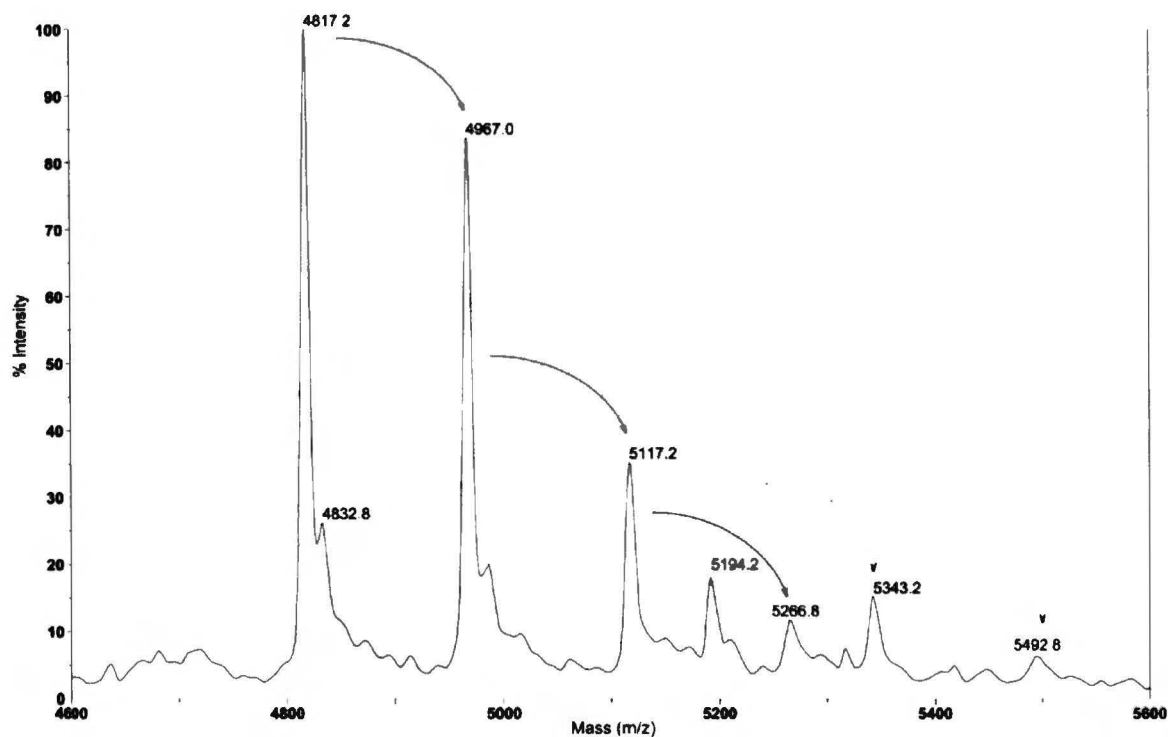


Rysunek 8.15. Widmo MALDI produktów reakcji alkilowania oligomeru $d(\text{GCGATCGC})_2$ solą $\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT}$ CF_3SO_3^- po naświetlaniu UV, pokazujące region koniugatu alkilowanej pojedynczej nici (SS). Ciągłe strzałki wskazują niealkilowaną pojedynczą nić DNA, a przerywane koniugat z pochodną TPT.

Sygnał, $m/z = 2407.7$ $(\text{M}-\text{H})^-$ reprezentuje pojedynczo naładowany jon pojedynczej nici nukleotydu DNA (SS) (rysunek 8.15). Towarzyszą mu równooddalone (o +150) sygnały odpowiadające adduktom oligonukleotydu z obecnym w mieszaninie preakcyjnej kwasem $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$. Sygnał $m/z = 2784.7$ $(\text{M}-\text{H})^-$ odpowiada koniugatowi wyjściowego oligonukleotydu (SS) z fragmentem QM (MW = 377), którego formalną strukturę pokazano na rysunku 8.16. Sygnałowi temu również towarzyszą sygnały adduktu $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ do oligonukleotydu.

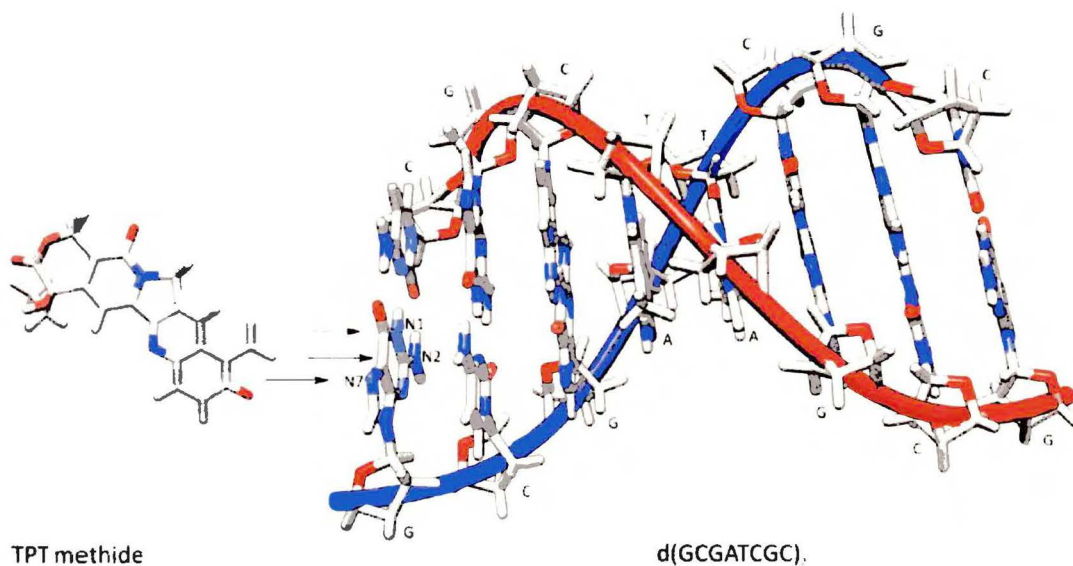


Rysunek 8.16. Schematyczne przedstawienie możliwych miejsc alkirowania guanozyny (zaznaczone strzałkami atomy N1, N2 i N7) w pojedynczej nici oligomeru GCGATCGC (SS) przez związek typu QM topotekanu.



Rysunek 8.17. Widmo MALDI produktów reakcji alkirowania oligomeru $d(\text{GCGATCGC})_2$ solą $\text{Me}_3\text{N}^+\text{TPT CF}_3\text{SO}_3^-$ po naświetlaniu UV, pokazujące region koniugatu alkirowanej podwójnej nici (DS). Ciągłe strzałki wskazują niealkirowaną pojedynczą nić DNA, a przerywane koniugat z pochodną TPT.

Sygnal $m/z = 4817.2$ (M-H)⁻ odpowiada pojedynczo naładowanemu dupleksowi (DS) oligonukleotydu, a sygnał przy $m/z = 5194.2$ (M-H)⁻ dupleksowi z przyłączonym fragmentem QM do jednej nici (rysunek 8.17). Formalną strukturę tego koniugatu pokazano na rysunku 8.18. Obu strukturom towarzyszą sygnały adduktów CF₃SO₃H z oligonukleotydem.



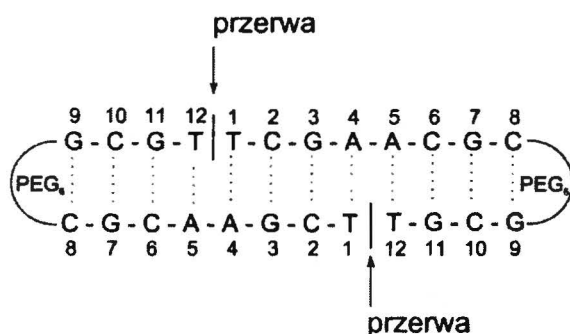
Rysunek 8.18. Schematyczne przedstawienie możliwych miejsc alkirowania guanozyny (zaznaczone strzałkami atomy N1, N2 i N7) w dupleksie d(GCGATCGC)₂ przez związek typu QM topotekanu.

Podsumowując, we wcześniejszych pracach pokazano, że TPT niekowalencyjnie przyłącza się do pary zasad GC. Jest to jednak słabe oddziaływanie, które uniemożliwia efektywną inhibicję tkanek nowotworowych. Powyższe eksperymenty dowodzą, że pochodna Me₃N⁺TPT CF₃SO₃⁻ łączy się kowalencyjnie z DNA podczas naświetlania światłem z zakresu bliskiego nadfioletu. Przyłączenie następuje zarówno do pojedynczej nici (SS), jak i do dupleksu DNA (DS). Toruje to drogę do nowych klinicznych zastosowań pochodnych TPT. Jeśli tkanki nowotworowe zostałyby naświetlone po podaniu leku, mogłyby to dramatycznie podnieść jego efekt terapeutyczny. Aktualnie prowadzone są próby rozdziału adduktu oraz określenia regioselektywności alkirowania.

9. Zagadnienia inhibicji topoizomerazy II

9.1. Badanie modelu szpilki i hantli

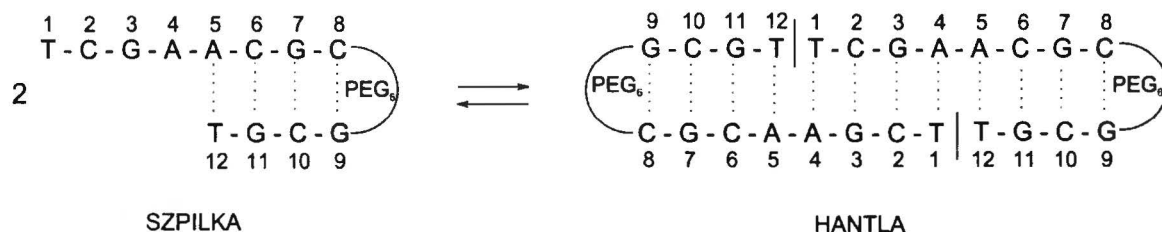
Podstawowym celem tego etapu pracy było opracowanie ogólnego modelu motywu hantli, umożliwiającego badanie oddziaływań inhibitorów topo II z DNA. Taki oligomer powinien zawierać w swojej strukturze dwie przerwy, imitujące wynik działania topo II. Zaprojektowana przez mnie cząsteczka to dupleks dodekameru DNA 5'-GCGT↓TCGAACGC-3'. Przerwana nić połączona jest z komplementarnym dodekamerem 3'-CGCAAGCT↓TGCG-5' dwoma mostkami polietylenoglikolowymi (PEG₆) na końcach 3' i 5'. Taki dupleks tworzy cząsteczkę w postaci hantli z dwiema przerwami typu „nick” (NICK II). Strukturę oligomeru DNA typu hantli użytego do badań pokazano na rysunku 9.1. Wybór nukleotydów wokół przerwy oparto na wynikach badań, z których wynika, że genisteina wymaga tyminy w obu pozycjach (-1 i +1).¹⁹⁶ Hantle składające się z dostatecznie długich szpilek i silnie parujących czterech zasad między przerwami w regionie dimeryzacji, są termodynamicznie trwałe jako dimery i charakteryzują się dostatecznie wysokimi temperaturami topnienia (40 – 50°C) do badań NMR w roztworze.⁴⁰ Zainteresowanie tą strukturą związane jest z problemem atakowania kompleksu topo – DNA przez genisteinę. Mechanizm tego procesu na poziomie atomowym nie jest dobrze poznany.



Rysunek 9.1. Oligomer DNA typu hantli.

Problem stosownego modelu rozciętego DNA jest związany z zagadnieniem równowagi motywów szpilki i hantli (schemat 9.1) w oligomerach DNA.^{17, 40} Znanych jest kilka prac dotyczących badań spektroskopowych oligonukleotydów z nienukleotydowymi mostkami.^{34, 36} Pewne uogólnienia dotyczące równowagi szpilka – hantla były dowiedzione wcześniej.⁴⁵ Ogólnie, forma szpilki jest faworyzowana przy jednoczesnym niewielkim stężeniu soli i oligomeru. Co ważniejsze, dynamika równowagi szpilka - hantla oraz jej położenie mocno zależy

od sekwencji par zasad, w szczególności w punkcie styczności dimeru, który w tym przypadku składa się tylko z czterech par zasad (TCGA).



Schemat 9.1. Równowaga szpilka – hantla.

Podstawowym celem początkowym było znalezienie warunków, w których motyw hantli byłby jedyną formą obserwowaną w roztworze. Aby dodekamer był dobrym modelem do badań oddziaływań z inhibitorami topo II, powinny być spełnione dwa warunki:

- 1) stężenie dodekameru musi być jak najmniejsze, ponieważ oligomery DNA w niskich temperaturach mają tendencję do tworzenia agregatów, co uniemożliwia rejestrację widm NMR opartych na sprzężeniach skalarnych (ze względu na poszerzenie sygnałów);
- 2) powinno być możliwe nasycenie roztworu ligandami organicznymi (inhibitorami topo II), które są z reguły trudno rozpuszczalne w wodzie. Z tego powodu stężenie soli powinno być możliwie niskie, by zapobiec wysalaniu ligandów organicznych.

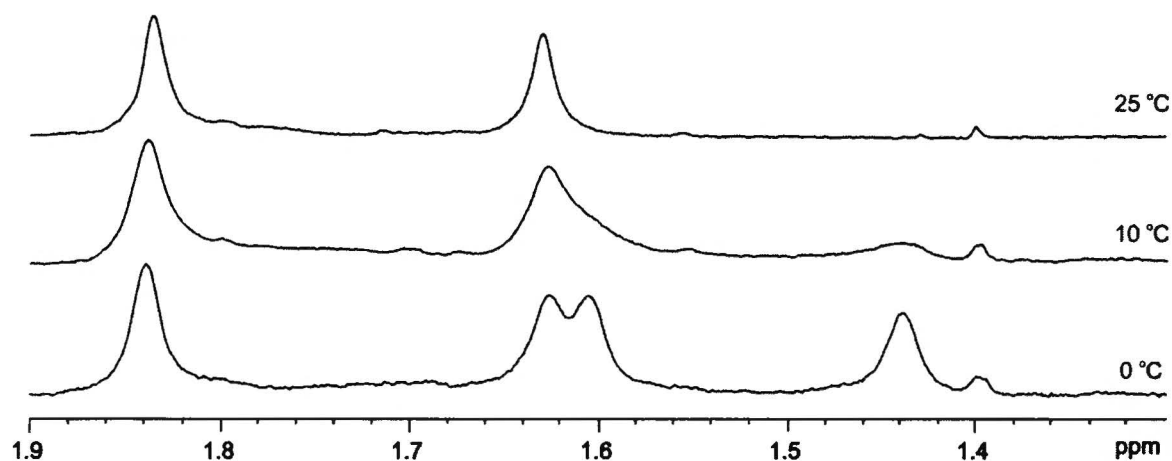
Nie można w tym przypadku wprowadzić par G-C w punkcie styczności końców łańcucha, które sprzyjają tworzeniu dupleksu, ze względu na preferencję genisteiny do tymidyn w pozycjach -1 i +1. Przeprowadzono więc analizę wpływu stężenia dodekameru, siły jonowej oraz rozpuszczalnika na równowagę szpilka – hantla. Celem było znalezienie warunków, które faworyzowałyby formę hantli przy stężeniu *ca* 1 – 2 mM dodekameru (podane stężenie dotyczy motywu szpilki; ta konwencja będzie stosowana w dalszej części pracy) i umożliwiły rejestrację widm z wąskimi sygnałami. Pozwoliłoby to na wykonanie widm opartych na sprzężeniach skalarnych.

Obserwację wpływu różnych czynników na równowagę szpilka – hantla na widmach ^1H NMR prowadzono w oparciu o diagnostyczny region sygnałów metylowych pochodzących od tymidyn (zakres 1 – 2 ppm). Region ten wybrano ze względu na ograniczoną ilość sygnałów w tym obszarze, co bardzo upraszcza interpretację. Motyw hantli jest symetryczny i ilość sygnałów na

widmach NMR nie zmienia się w porównaniu z motywem szpilki. W oparciu o wyniki wybrano warunki, w których scharakteryzowano oba motywy.

9.1.1. Wpływ temperatury na równowagę szpilka – hantla

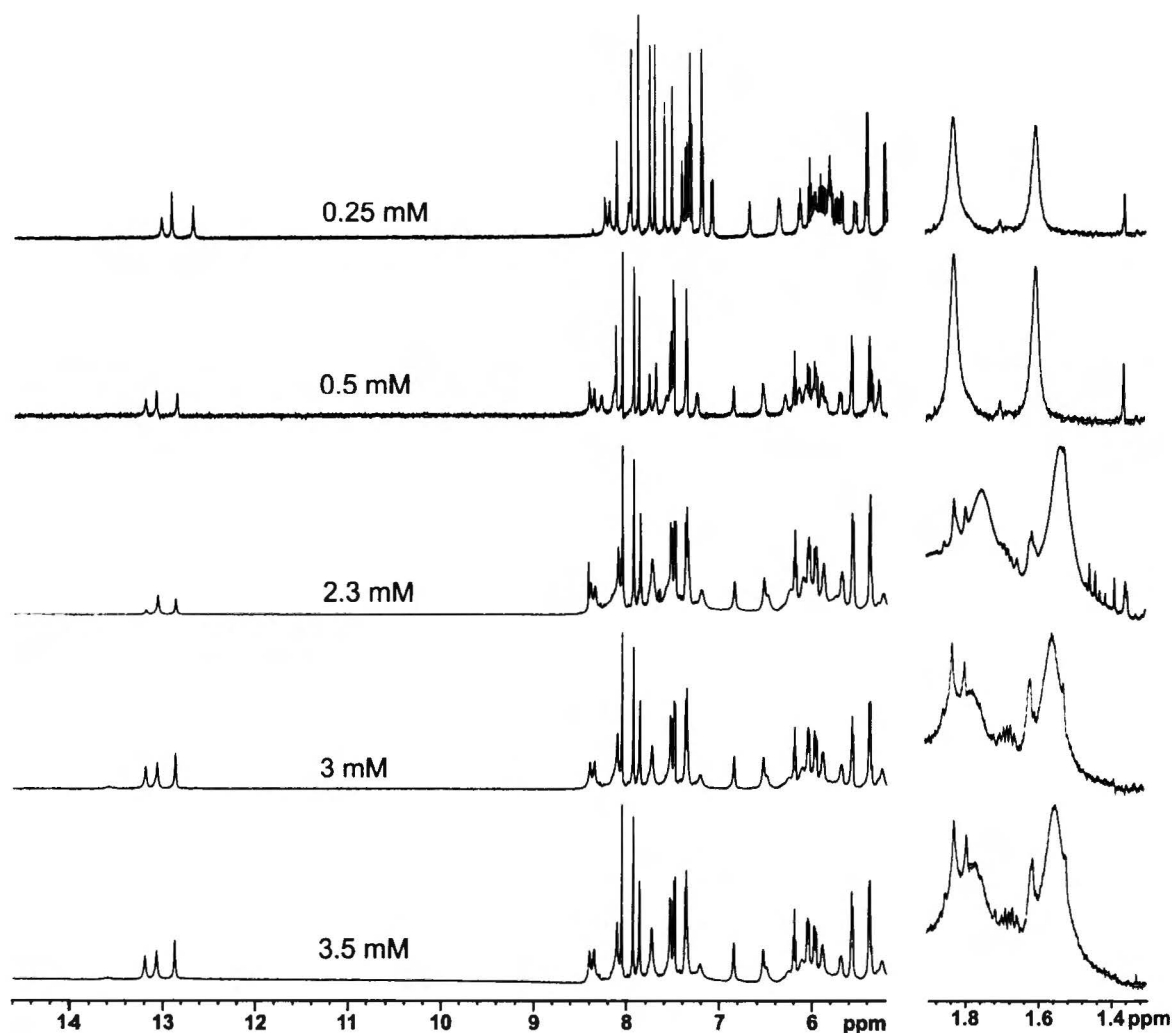
Na rysunku 9.2 pokazano temperaturową zależność równowagi szpilka – hantla w roztworze 0.4 mM DNA w buforze wodnym (25/25 mM NaCl/K₃PO₄, pH 6.1). W 25°C widoczny jest tylko jeden zestaw sygnałów pochodzących od grup metylowych tymidyn (1.84 i 1.63 ppm). Zestaw ten przypisano strukturze szpilki, ponieważ wiadomo, że przy tak niskim stężeniu forma szpilki dominuje w roztworze. Widmo wykonane w tych warunkach posłużyło później do scharakteryzowania motywu szpilki (rysunek 9.9, tabela 9.1). Obniżenie temperatury wpływa na zwiększenie integracji drugiego zestawu sygnałów (1.44, 1.60 ppm), przypisanego strukturze hantli. W 10°C ma miejsce pośrednia (w skali NMR) szybkość wymiany obu form, o czym świadczy poszerzenie sygnałów. W 0°C wymiana obu form jest wolna. Dowodem na to jest prawie taka sama szerokość połówkowa sygnałów, mimo że obie formy występują w różnej ilości (forma hantli osiąga *ca* 25% populacji). Widmo wykonane w 0°C nie nadaje się do badania struktury, ze względu na nałożenie się sygnałów pochodzących od dwóch form obecnych w roztworze. Samo obniżenie temperatury nie jest wystarczającym czynnikiem do zwiększenia stężenia hantli do pożądanego poziomu.



Rysunek 9.2. Fragmenty widm ¹H NMR roztworu 0.4 mM DNA w buforze H₂O 25/25 mM NaCl/K₃PO₄, pH 6.1 w różnych temperaturach.

9.1.2. Wpływ stężenia dodekameru na równowagę szpilka – hantla

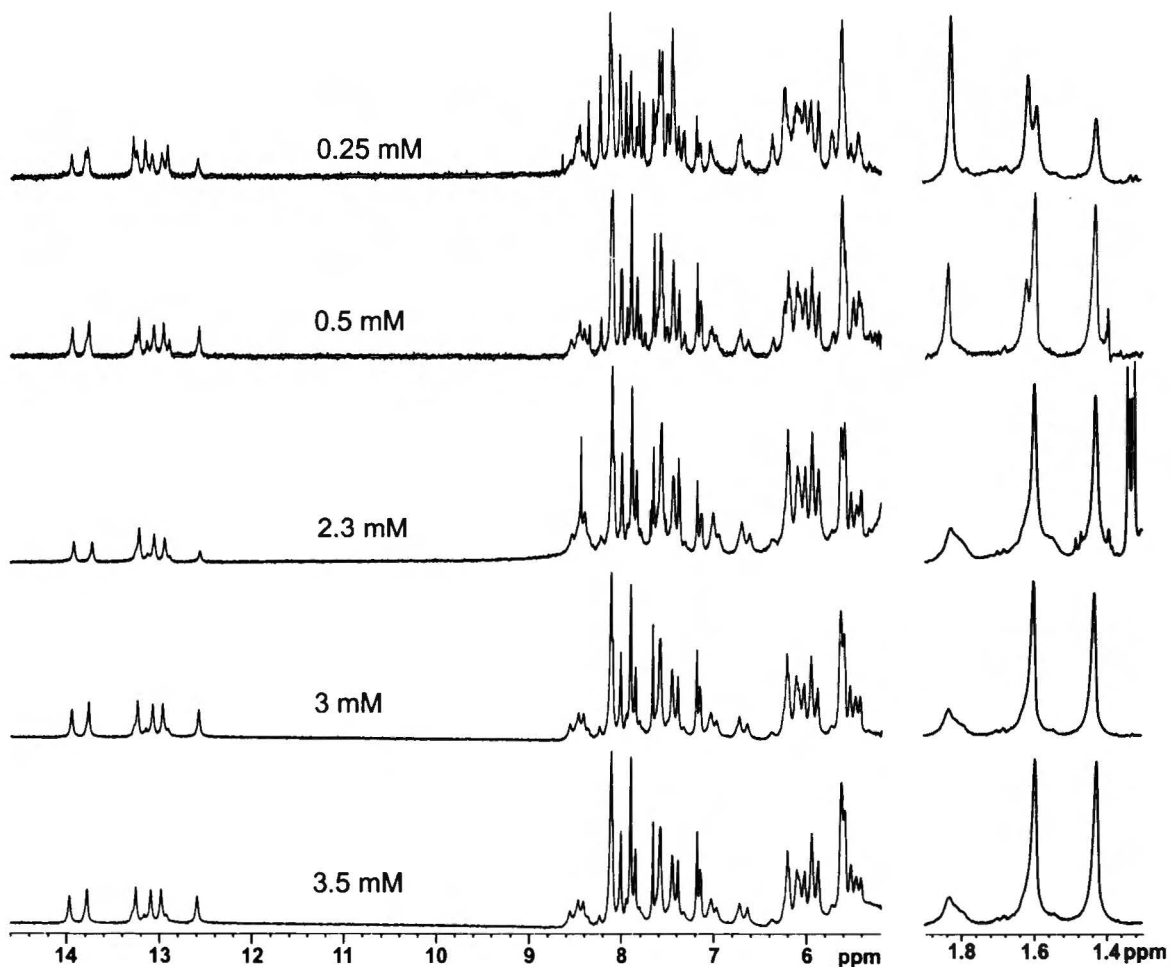
Kolejnym badanym czynnikiem wpływającym na równowagę obu motywów było stężenie dodekameru. Przeprowadzono eksperyment rozcieńczania roztworu dodekameru od stężenia 3.5 mM do 0.25 mM, a otrzymane widma pokazano na rysunkach 9.3 i 9.4. W 25°C (rysunek 9.3) przy stosunkowo dużym stężeniu DNA (3.5 mM), w zakresie alifatycznym widać zmianę przesunięć protonów pochodzących od tymidyn (w porównaniu z widmami wykonanymi przy niższych stężeniach), lecz cały fragment jest tak poszerzony, że trudno jednoznacznie określić stosunek obu motywów.



Rysunek 9.3. Fragmenty widm ^1H NMR roztworu DNA o różnych stężeniach w buforze 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , pH 6 w 25°C.

Z tego powodu wykonano analogiczne widma w temperaturze 0°C (rysunek 9.4), ponieważ, jak wynikało z poprzednich obserwacji, obniżenie temperatury wpływa na wzrost stężenia hantli.

Tutaj, obniżenie temperatury w wyraźny sposób wpłynęło na wyostrenie sygnałów pochodzących od tymidyn. Na widmie wykonanym dla stężenia 0.25 mM DNA, w zakresie protonów metylowych tymidyn obserwujemy dwa zestawy sygnałów, pochodzące od obu form dodekameru, a na podstawie intensywności sygnałów można ustalić, że forma hantli stanowi mniej niż 25% populacji. Możliwa była również obserwacja dziesięciu sygnałów w zakresie 12.5 – 14 ppm, pochodzących od protonów NH. Sześć z nich, o większej intensywności, przypisano strukturze hantli. W tej temperaturze, przy stężeniu 0.5 mM obie formy obecne są praktycznie w tej samej ilości. Dla kolejnych stężeń forma hantli dominuje.



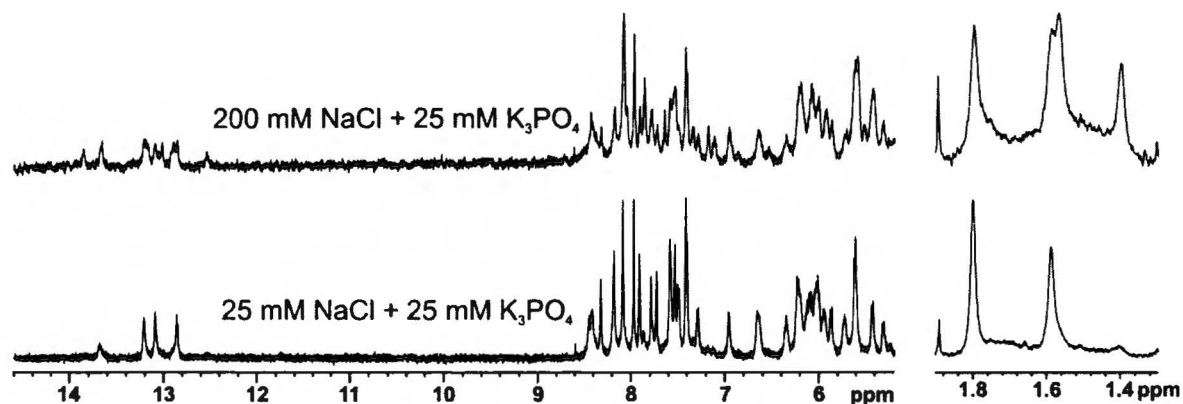
Rysunek 9.4. Fragmenty widm ^1H NMR roztworu DNA o różnych stężeniach w buforze 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , pH 6 w 0°C .

Widmo wykonane w tych warunkach przy stężeniu dodekameru 3.5 mM posłużyło później do scharakteryzowania motywu hantli (rysunek 9.10, tabela 9.2). Udało się więc uzyskać układ, w którym przy stosunkowo niskim stężeniu dodekameru (ca 2 mM) forma hantli jest motywem dominującym w roztworze. Jednak niska temperatura badanego układu byłaby prawdopodobnie

czynnikiem wpływającym na zmniejszenie rozpuszczalności ligandów organicznych. Wskazane więc były dalsze badania w tym zakresie, obejmujące wpływ siły jonowej oraz dodatku innego rozpuszczalnika.

9.1.3. Wpływ siły jonowej na równowagę szpilka – hantla

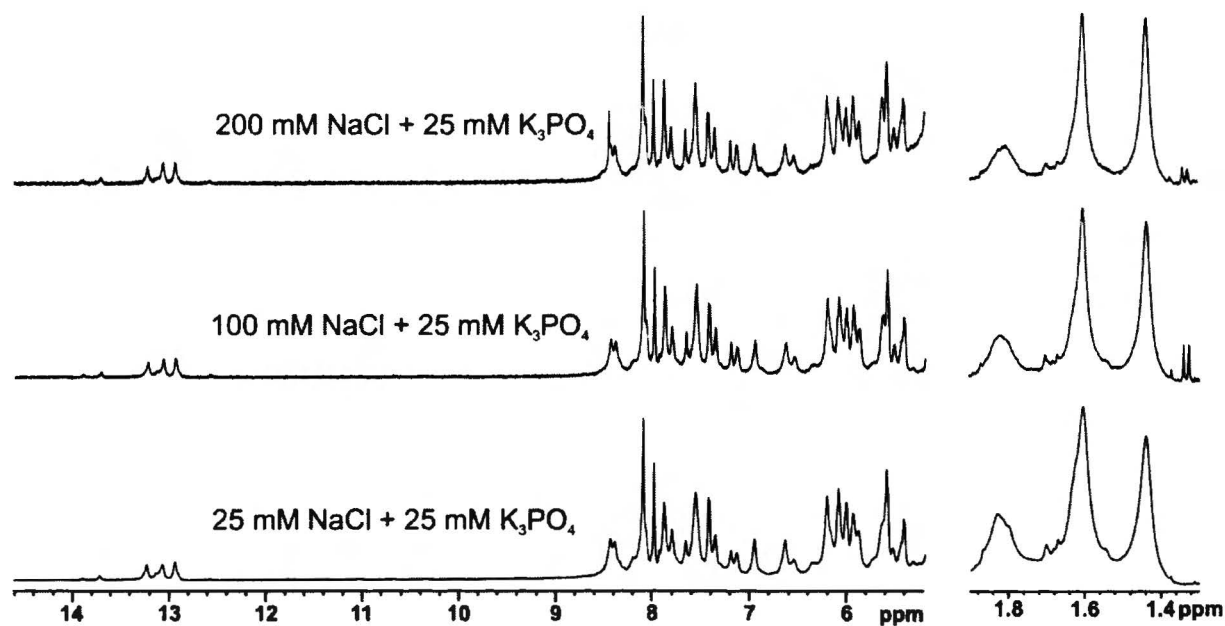
Zwiększenie siły jonowej to klasyczne podejście umożliwiające wzrost stężenia hantli w roztworze. W tym przypadku było to niewystarczające dla stężeń dodekameru 0.25 mM wykonanych w 10°C (rysunek 9.5). Widma wykonane przy niskim stężeniu buforu (25 mM NaCl/25 mM K₃PO₄) wskazują na obecność wyłącznie motywu szpilki. Podwyższenie stężenia soli (200 mM NaCl/25 mM K₃PO₄) wpływa na pojawienie się sygnałów pochodzących od hantli, ale stężenie tej formy jest niższe niż stężenie motywu szpilki.



Rysunek 9.5. Fragmenty widm ¹H NMR roztworu 0.25 mM DNA w buforach różniących się stężeniem NaCl, pH 6 w 10°C. Na widmie dolnym widoczny jest jedynie motyw szpilki, na górnym również motyw hantli.

Sprawdzono więc wpływ siły jonowej dla większego stężenia dodekameru, w tej samej temperaturze (10°C). Na rysunku 9.6 pokazano widma wykonane przy stężeniu 1.9 mM dodekameru i różnych ilościach NaCl (100 mM NaCl/25 mM K₃PO₄ oraz 200 mM NaCl/25 mM K₃PO₄). Dla porównania, pokazano również widmo, na którym widoczny jest wyłącznie motyw hantli, tzn. widmo wykonane przy stężeniu dodekameru wynoszącym 3.5 mM i niskim stężeniu soli (również 10°C, widmo dolne na rysunku 9.6). Podwyższenie stężenia dodekameru do *ca* 2 mM pozwala przesunąć równowagę w stronę hantli w 10°C. Zwiększenie stężenia NaCl do 200 mM, pozwala uzyskać motyw hantli w ilości większej, niż uzyskana przy stężeniu 3.5 mM dodekameru i niskim stężeniu buforu.

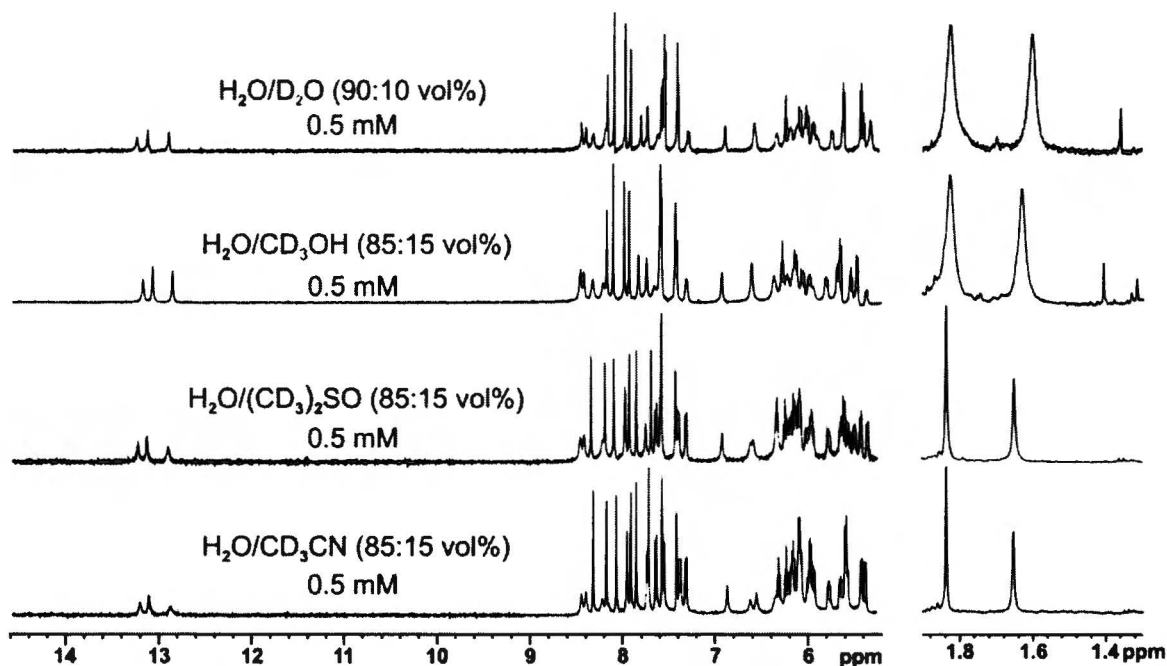
Potwierdzono więc, że wzrost siły jonowej wpływa na wzrost stężenia motywu hantli, ale w ograniczonym stopniu (tzn. tylko dla stężeń dodekameru *ca* 2 mM). Nie udaje się natomiast w ten sposób uzyskać pożądanej ilości hantli w układach o stężeniu DNA rzędu 0.5 mM.



Rysunek 9.6. Fragmenty widm ^1H NMR roztworu DNA w buforach różniących się stężeniem NaCl, pH 6 w 10°C . Dolne widmo przedstawia motyw hantli w roztworze DNA o stężeniu 3.5 mM dodekameru, pozostałe widma zarejestrowano przy stężeniu 1.9 mM dodekameru.

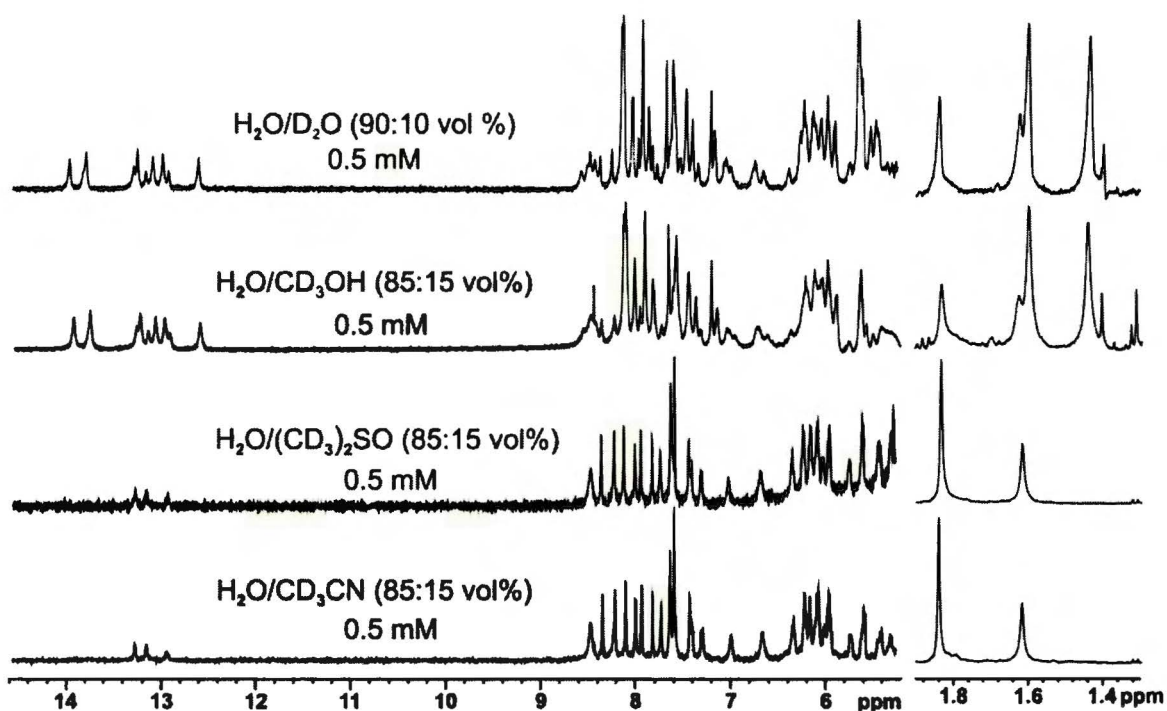
9.1.4. Wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego na równowagę szpilka – hantla

Następnie przeanalizowano wpływ dodatku różnych rozpuszczalników na równowagę szpilka - hantla. Przy badanym stężeniu 0.5 mM w 25°C w wodzie obecna jest tylko forma szpilki (rysunek 9.7). Dodatek 15% obj. CD_3OH nie wpływa znacząco na widmo i proporcja szpilka : hantla jest zachowana. Zupełnie inna sytuacja jest w przypadku rozpuszczalników aprotycznych, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ i CD_3CN , dla których wartości stałej dielektrycznej są niższe, niż dla wody. Dodatek tych rozpuszczalników skutkuje wyraźnym zwężeniem sygnałów na widmie, co świadczy o braku wymiany między dwiema formami w tych warunkach (rysunek 9.7). W tych układach występuje jedynie motyw szpilki.



Rysunek 9.7. Fragmenty widm ^1H NMR roztworów 0.5 mM DNA w buforach 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , różniących się dodatkiem rozpuszczalnika, pH 6 w 25°C .

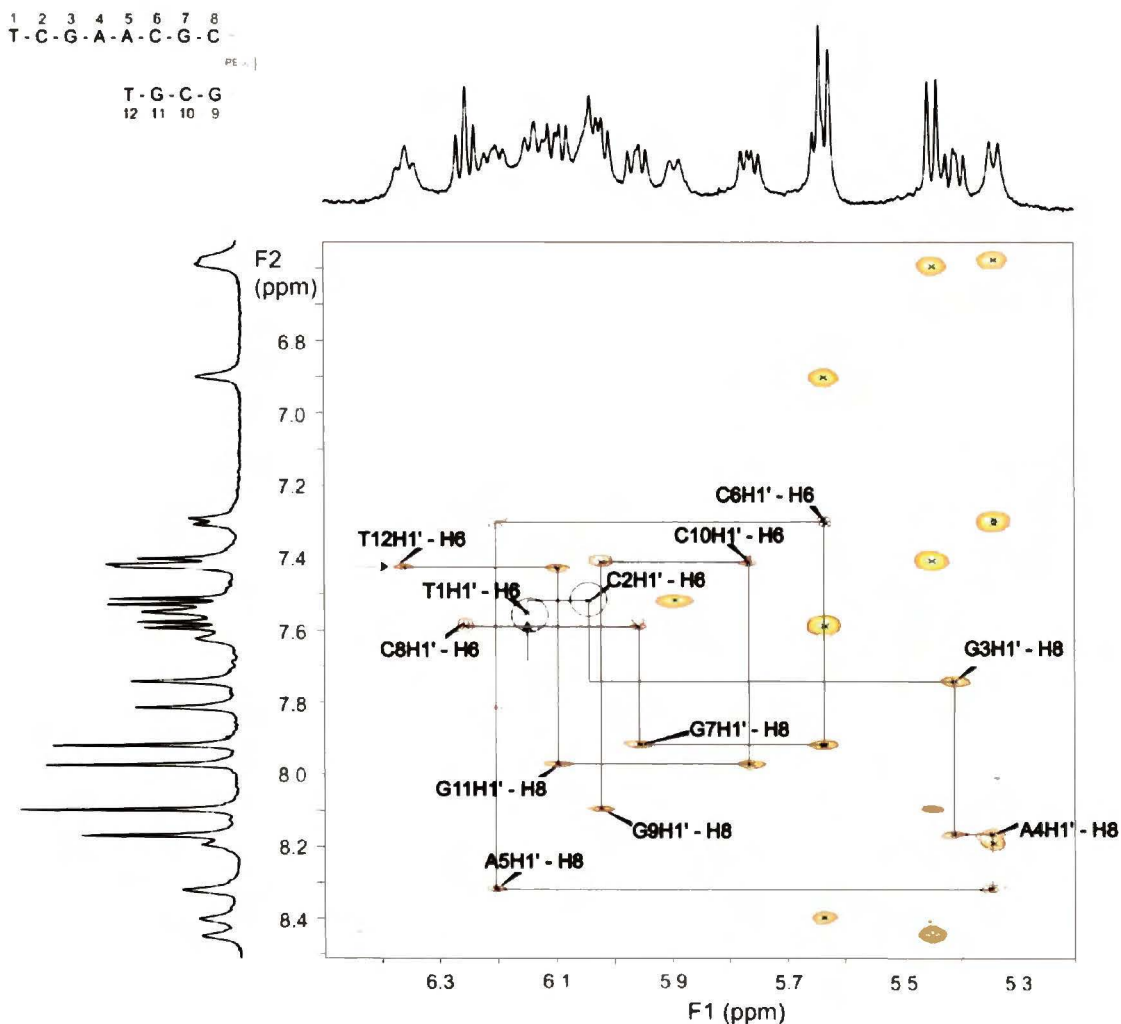
Przy takim samym stężeniu dodekameru w 0°C w samej wodzie obecne jest ok. 50% mol hantli (sygnały 1.60 i 1.44 ppm, rysunek 9.8). Dobrze widoczne są dwa nakładające się zestawy sygnałów motywów szpilki i hantli, które są w stanie wolnej wymiany, na co wskazuje poszerzenie sygnałów. Dodatek 15% obj. metanolu skutkuje nieznacznym zwiększeniem ilości hantli, nie powoduje natomiast zwężenia sygnałów na widmie. Prawdopodobnie nawet w tak niskiej temperaturze i stężeniu nie można uniknąć agregacji motywów hantli, a ruchy molekularne są spowolnione, co prowadzi do poszerzenia widma. Po dodaniu $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ lub CD_3CN na widmie widoczny jest tylko jeden zestaw sygnałów, przypisany do motywu szpilki (1.84 i 1.63 ppm). Sygnały są również znacznie bardziej ostre, co wskazuje na brak wymiany pomiędzy dwoma motywami w tej temperaturze. Oba rozpuszczalniki zapobiegają dimeryzacji, ale umożliwiają tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Podobny efekt zaobserwowany niedawno w badaniach wpływu acetonitrylu na agregację insuliny ludzkiej w układzie $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (65 : 35% *vol.*). Zakłóca to czwartorzędową strukturę białka, lecz struktura trzeciorzędowa pozostaje nietknięta, co pozwala wyjaśnić strukturę monomeru przy stężeniu umożliwiającym pomiary NMR.¹⁹⁷ Dodatek metanolu wpływa nieznacznie na równowagę szpilka – hantla. Jest to bardzo korzystne, ponieważ zastosowanie takiego układu powinno poprawić rozpuszczalność ligandów organicznych (flawonoidów) i umożliwić nasycenie nimi roztworu dodekameru.



Rysunek 9.8. Fragmenty widm ^1H NMR roztworów 0.5 mM DNA w buforach 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , różniących się dodatkiem rozpuszczalnika, pH 6 w 0°C .

Z uwzględnieniem wpływu powyższych czynników na równowagę szpilka – hantla, wybrano warunki umożliwiające przypisanie sygnałów obu motywów. Motyw szpilki scharakteryzowano w temperaturze pokojowej, przy stężeniu dodekameru 0.6 mM oraz niskim stężeniu buforu (25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , pH=6). Są to warunki zbliżone do fizjologicznych, nie ma również wymiany z motywem hantli. Fragment „fingerprint” widma NOESY motywu szpilki pokazano na rysunku 9.9, a w tabeli 9.1 podano przesunięcia chemiczne ^1H NMR.

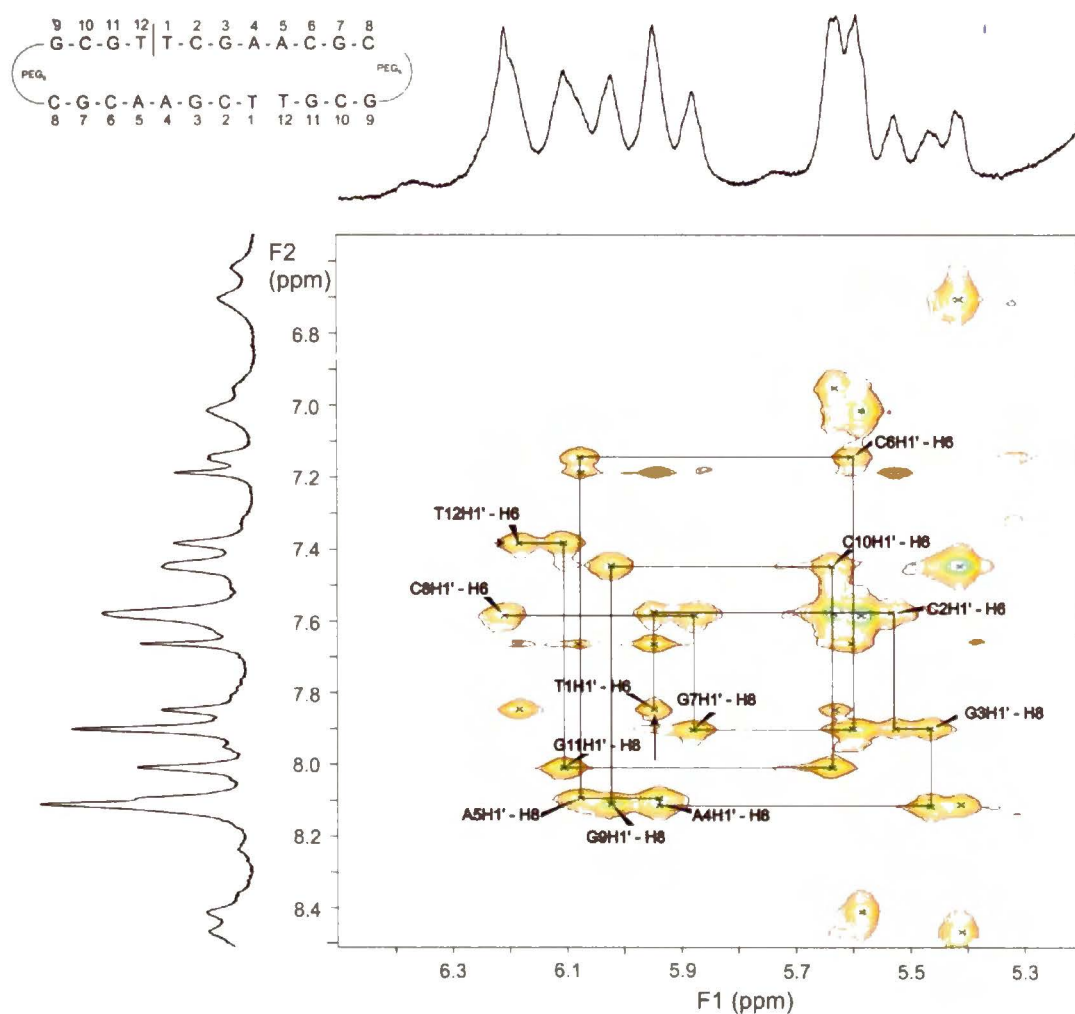
Motyw hantli scharakteryzowano przy znacznie większym stężeniu dodekameru (3.5 mM), niskim stężeniu buforu (25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , pH=6) i w temperaturze 0°C , co umożliwiło obserwację hantli jako jedynej formy w roztworze. Fragment „fingerprint” widma NOESY motywu hantli oraz przesunięcia chemiczne ^1H NMR podano, odpowiednio, na rysunku 9.10 i w tabeli 9.2. Na rysunku 9.11 pokazano zakres protonów iminowych, pokazujący międzyciniowe oddziaływania NOE w motywie hantli.



Rysunek 9.9. Region „fingerprint” widma NOESY szpilki DNA w 25°C, 0.6 mM, pH 6, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄. Brakujące sygnały oznaczono czarnymi kółkami. Początek i koniec sekwencji oznaczono strzałkami.

zasada	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5', H5''	H6/8	H2/5/Me	NH ₂	NH
T1	6.14	na*	2.43	na	na	na	7.55	1.80	-	na
C2	6.04	na	2.24	na	na	na	7.52	5.90	na	-
G3	5.41	na	2.40	4.88	4.18	3.92, 3.97	7.74	-	na	na
A4	5.34	na	2.62	4.94	4.04	na	8.17	na	na	na
A5	6.20	2.83	2.86	5.06	4.46	4.09, 4.16	8.32	na	na	na
C6	5.64	1.97	2.34	4.84	4.20	na	7.30	5.34	6.57; 8.19	-
G7	5.96	2.64	2.73	5.02	4.39	4.09, 4.15	7.92	-	na	13.10
C8	6.26	2.26	2.48	4.87	4.22	na	7.59	5.64	6.90; 8.40	-
G9	6.02	2.79	2.86	4.98	4.35	3.90, 4.01	8.10	-	na	13.22
C10	5.76	2.11	2.44	4.89	4.23	na	7.41	5.45	6.59; 8.45	-
G11	6.09	2.70	2.82	5.05	4.43	4.11, 4.18	7.97	-	na	12.87
T12	6.36	2.43	2.50	4.93	4.29	3.98, 4.05	7.43	1.63	-	na

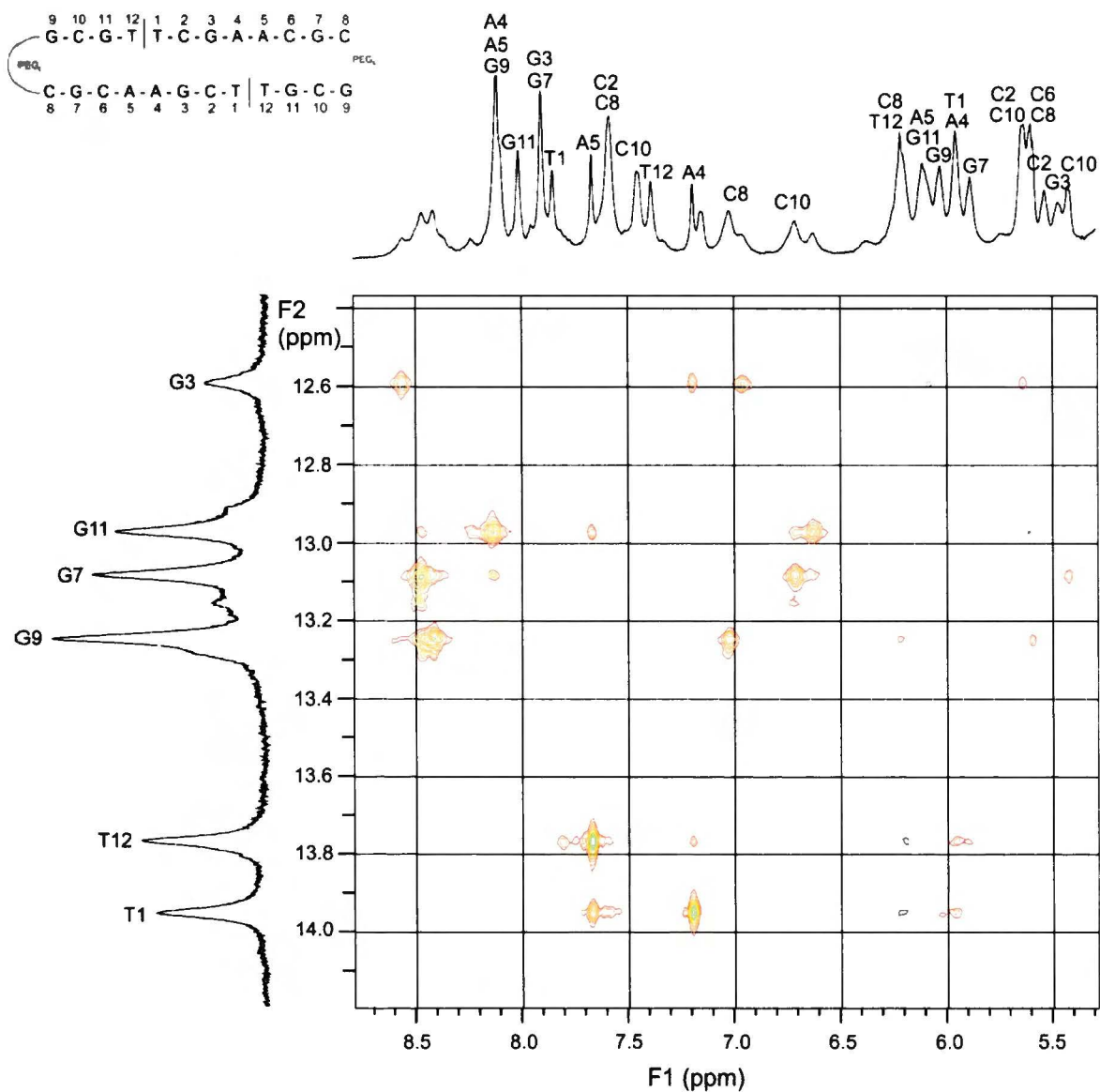
Tabela 9.1. Przesunięcia chemiczne (ppm) ¹H motywu szpilki w H₂O/D₂O (9:1) w 25°C, 0.6 mM, pH 6, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄; *nie przypisane (not assigned).



Rysunek 9.10. Region „fingerprint” widma NOESY hantli DNA w 0°C, 3.5 mM, pH 6, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄. Początek i koniec sekwencji oznaczono strzałkami.

zasada	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5', H5''	H6/8	H2/5/Me	NH ₂	NH
T1	5.95	2.13	2.55	4.71	4.18	3.91	7.85	1.60	-	13.95
C2	5.53	2.00	2.36	4.84	4.14	na	7.57	5.63	6.95; 8.56	-
G3	5.47	2.69	2.76	4.99	4.32	na	7.90	-	na	12.59
A4	5.94	2.69	2.90	5.07	4.17	na	8.11	7.19	na	-
A5	6.08	2.56	2.84	na*	4.44	na	8.10	7.66	na	-
C6	5.61	1.82	2.27	4.80	4.12	na	7.15	5.18	6.62; 8.13	-
G7	5.88	2.61	2.69	4.98	4.36	na	7.90	-	na	13.09
C8	6.21	2.26	2.46	4.85	4.20	na	7.58	5.59	7.02; 8.41	-
G9	6.03	2.81	2.86	4.98	4.35	3.88; 4.01	8.11	-	na	13.25
C10	5.64	2.22	2.46	4.89	4.24	na	7.45	5.42	6.71; 8.47	-
G11	6.10	2.73	2.88	5.06	4.46	4.19	8.01	-	na	12.97
T12	6.19	2.36	2.42	4.96	4.26	na	7.38	1.44	-	13.77

Tabela 9.2. Przesunięcia chemiczne (ppm) ¹H motywu hantli w H₂O/D₂O (9:1) w 0°C, 3.5 mM, pH 6, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄; * nie przypisane (not assigned).



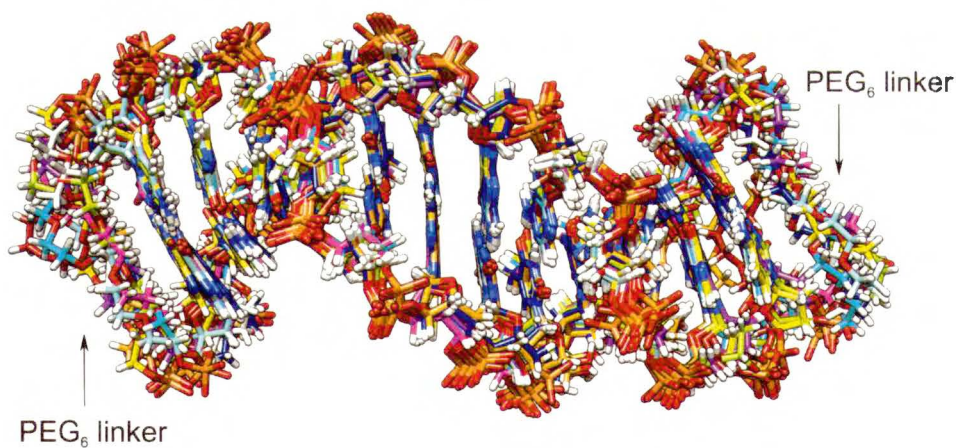
Rysunek 9.11. Region protonów iminowych widma NOESY hantli DNA w 0°C, 3.5 mM, pH 6, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄.

Wykorzystując wcześniejsze rezultaty, wykonano również widmo dodekameru z dodatkiem CD₃OH, przy wysokim stężeniu soli (25/200 mM NaCl/K₃PO₄, pH=6) oraz ponad trzykrotnie mniejszym stężeniu DNA (1 mM). Widmo to było niemal identyczne z widmem wykonanym przy wysokim (3.5 mM) stężeniu dodekameru w buforze H₂O, a wartości przesunięć chemicznych różniły się o *ca* 0.02 ppm. Udało się więc uzyskać układ, w którym przy umiarkowanym stężeniu DNA dominuje motyw hantli, a wpływ dodatku rozpuszczalnika na zmianę przesunięć chemicznych jest znikomy.

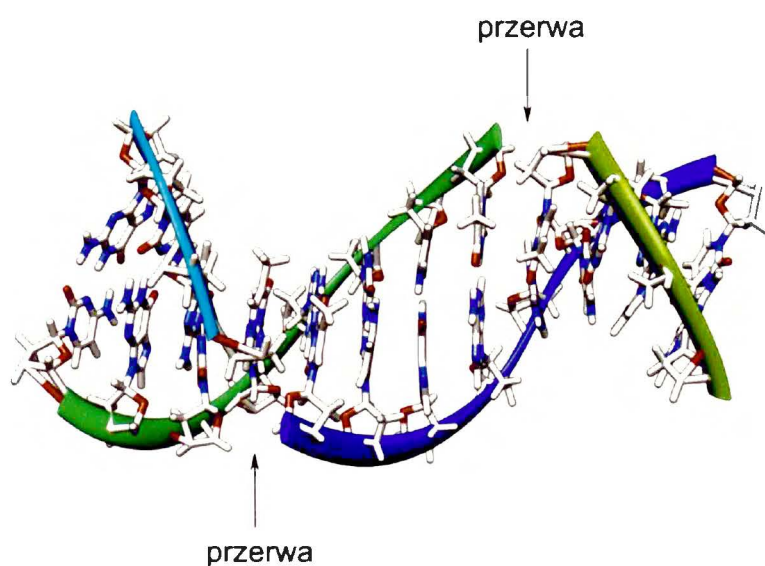
9.1.5. Obliczenie struktury hantli

Wykorzystując sygnały korelacyjne z widma NOESY dodekameru, wykonanego w 0°C (rysunek 9.10), podjęto próbę obliczenia struktury hantli. Widmo ^1H NMR jest dość szerokie, dlatego tylko widmo NOESY może być źródłem więzów eksperymentalnych. Rejestracja widm TOCSY i HSQC, które są pomocne do przypisania protonów deoksyrybozy, nie była możliwa ze względu na dużą szerokość połówkową sygnałów. Udało się zaobserwować wszystkie ważne międzyciowe oddziaływania NOE (rysunek 9.11), możliwe więc było uzyskanie wystarczającej ilości objętości sygnałów korelacyjnych do obliczeń MD.

Na rysunku 9.12 pokazano dziesięć nałożonych na siebie struktur dodekameru DNA z dwiema przerwami, obliczonych z wykorzystaniem ogólnego modelu Borna (GB), symulującego obecność rozpuszczalnika. Analiza obliczonych parametrów helikalnych (tabele 9.3 i 9.4) wskazuje na regularną formę B-helisy (definicje parametrów helikalnych zamieszczono na początku pracy, s. 10-11). Wynika z tego, że obecność dwóch przerw nie wpływa w znaczący sposób na kształt helisy.



Rysunek 9.12. Nałożenie 10-ciu obliczonych struktur hantli dodekameru DNA z dwiema przerwami typu „nick”.



Rysunek 9.12. Struktura pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA z widocznymi przerwami typu „nick”; pominięto łącznik PEG₆.

para zasad	x- displacement dx (Å)	y- displacement dy (Å)	inclination η (°)	tip θ (°)	buckle κ (°)	propeller twist Ω (°)	opening (σ) (°)
G9 - C8	-1.40±0.24	1.22±0.22	5.43±1.91	-12.78±1.72	19.61±6.17	1.80±7.09	3.62±2.65
C10 - G7	-1.67±0.21	1.03±0.17	5.03±2.38	-12.53±1.85	15.48±4.36	-15.76±6.25	-4.33±1.28
G11 - C6	-1.61±0.22	0.66±0.19	-0.65±2.06	-3.43±1.01	7.37±3.24	-28.64±3.80	0.07±1.75
<u>T12 - A5</u>	-1.30±0.17	0.16±0.14	-5.01±1.77	-0.96±1.62	-17.99±2.51	-14.02±4.56	8.85±1.07
T1 - A4	-1.02±0.17	0.34±0.15	-6.42±1.57	-11.48±1.33	-3.65±1.52	13.04±3.36	4.19±1.41
C2 - G3	-1.30±0.16	-0.13±0.14	-7.48±1.82	0.39±0.89	-10.18±1.48	16.53±2.33	-0.24±1.17
G3 - C2	-1.30±0.17	0.08±0.15	-7.26±1.86	0.17±1.47	9.35±3.81	15.00±4.85	0.25±1.81
<u>A4 - T1</u>	-1.02±0.15	-0.38±0.14	-6.43±1.78	11.79±1.47	3.37±1.81	15.11±4.83	4.41±1.73
A5 - T12	-1.31±0.17	-0.22±0.16	-4.99±1.65	1.34±1.31	19.06±1.36	-12.67±1.75	8.34±1.17
C6 - G11	-1.62±0.17	-0.77±0.17	-0.03±1.65	4.25±0.94	-8.41±2.55	-29.27±3.14	-0.62±1.90
G7 - C10	-1.68±0.20	-1.12±0.20	5.37±1.75	13.00±1.18	-12.41±3.55	-16.87±6.01	-4.20±1.42
C8 - G9	-1.33±0.22	-1.33±0.25	6.17±1.80	13.23±1.26	-15.67±5.77	4.72±3.93	6.06±2.96
średnia	-1.38±0.16	-0.04±0.14	-1.35±1.61	0.25±0.73	0.50±1.12	-4.25±1.22	2.20±0.49
B-DNA*	-0.71	0.0	-5.91	0.0	0.0	3.72	-4.11
A-DNA*	-5,43	0.0	19.09	0.0	0.0	13.7	-4.61

Tabela 9.3. Wybrane parametry helikalne w obliczonej strukturze hantli. Położenie przerwy „nick” zaznaczono kolorem czerwonym; *formy kanoniczne.

sekwencja par zasad	shift Dx (Å)	slide Dy (Å)	rise Dz (Å)	tilt τ (°)	roll ρ (°)	twist Ω (°)
G9 - C10	-0.44±0.16	-0.88±0.19	3.56±0.22	5.03±2.06	6.05±4.21	29.34±1.47
C10 - G11	0.17±0.20	-1.25±0.25	3.41±0.17	-2.90±1.07	28.59±4.13	28.52±2.52
G11 - T12	0.44±0.08	-1.69±0.17	3.85±0.14	-0.09±1.09	7.68±3.06	31.73±1.02
T12 - T1	0.74±0.11	-0.64±0.10	3.38±0.04	4.20±0.40	-23.54±2.81	36.43±1.42
T1 - C2	-0.26±0.13	-1.91±0.07	3.39±0.08	-0.75±0.59	22.49±2.26	22.77±1.08
C2 - G3	0.01±0.17	-0.70±0.17	2.81±0.11	0.33±1.58	-0.08±4.37	36.32±2.06
G3 - A4	0.25±0.12	-1.86±0.18	3.38±0.12	0.33±1.05	21.66±3.53	22.33±1.12
A4 - A5	-0.72±0.11	-0.68±0.13	3.38±0.06	-4.15±0.70	-24.04±1.65	36.28±1.01
A5 - C6	-0.46±0.09	-1.78±0.13	3.90±0.11	0.19±0.47	8.01±1.33	32.38±0.73
C6 - G7	-0.17±0.17	-1.15±0.26	3.33±0.10	1.21±0.84	28.12±2.22	27.42±2.18
G7 - C8	0.59±0.15	-0.84±0.18	3.57±0.17	-4.72±1.41	6.53±2.75	28.74±1.07
średnia	0.01±0.03	-1.22±0.06	3.45±0.03	-0.12±0.25	7.41±0.64	30.21±0.51
B-DNA*	0.0	0.0	3.38	0.0	0.0	36.0

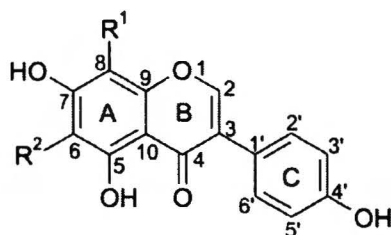
Tabela 9.4. Wybrane parametry helikalne w obliczonej strukturze hantli. Położenie przerwy „nick” zaznaczono kolorem czerwonym; *forma kanoniczna.

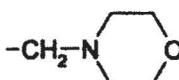
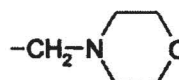
W porównaniu z regularnym ułożeniem par zasad wewnątrz struktury, odchylenia widoczne są w pobliżu przerw. Grupy 5-CH₂OH i 3'-PO₃ przy przerwie skierowane są na zewnątrz powierzchni cząsteczki i dlatego ich konformacja nie powinna wpływać na oddziaływanie z inhibitorem topo II.

9.2. Modyfikacje genisteiny

Podstawowym związkiem w grupie badanych inhibitorów topo II była genisteina (**1** na rysunku 9.13, Gen 1, ta numeracja będzie stosowana w dalszej części pracy). Otrzymano również nowe pochodne genisteiny, z podstawnikami w nieaktywnych biologicznie pozycjach 6 i 8. Podstawniki te zawierają grupy aminowe, które powinny poprawiać rozpuszczalność tych związków. Jedną z modyfikacji jest pochodna zawierająca dwa fragmenty morfolinowe w pozycjach 6 i 8 pierścienia A (**2** na rysunku 9.13, Gen 2). Kolejnym badanym związkiem jest pochodna zawierająca dwie grupy alkilo-N, N-dimetyloaminowe w pozycjach 6 i 8 pierścienia A (**3** na rysunku 9.13, Gen 3). Podobnie jak w przypadku topotekanu, pochodna ta również stosowana była w postaci chlorowodoru. Obie pochodne charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością w wodzie niż genisteina. Najlepiej rozpuszczalna jest pochodna **3**, dzięki czemu możliwe było uzyskanie układu zawierającego jedynie motyw hantli i jednocześnie molowy nadmiar pochodnej **3**. Ponieważ protony par 2'-H i 6'-H oraz 3'-H i 5'-H wszystkich pochodnych

mają identyczne przesunięcia chemiczne, dla uproszczenia będą opisywane jako, odpowiednio, 2'-H i 3'-H.



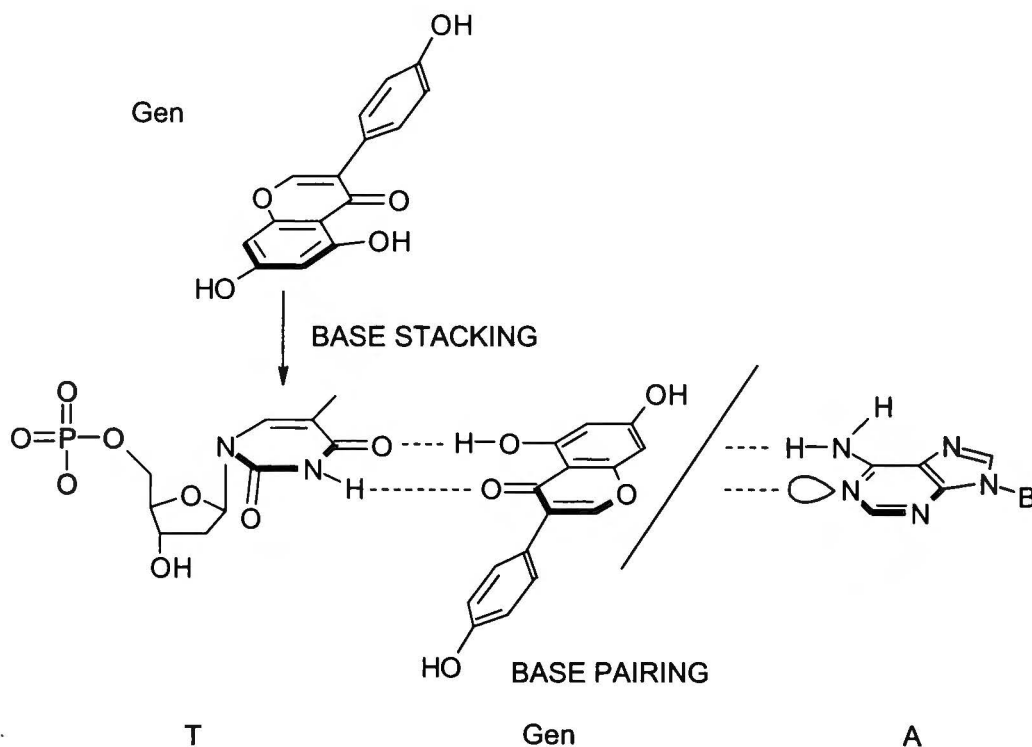
związek	R ¹	R ²
1	H	H
2		
3	-CH ₂ -NMe ₂	-CH ₂ -NMe ₂

Rysunek 9.13. Pochodne genisteiny wykorzystane do badań (numery związków będą stosowane w dalszej części pracy).

9.3. Oddziaływania genisteiny z DNA

9.3.1. Oddziaływanie tymidyna – genisteina

Na rysunku 9.14 pokazano teoretyczne sposoby oddziaływania genisteiny z tymidyną w parze T-A. Można przypuszczać, że oba rodzaje oddziaływań mogą dotyczyć tymidyny w parze T-A przy przerwie. Pierwszy sposób polega na interkalacji („base stacking”), drugi – na zamianie adeniny w parze zasad, poprzez utworzenie dwóch wiązań wodorowych z tymidyną („base pairing”). Ten ostatni sposób, mimo że geometrycznie możliwy, wymaga zerwania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w genisteinie oraz rozdzielenia pary T-A tworzącej dupleks. Z drugiej strony, interkalacja genisteiny w przerwie skutkuje rozciągnięciem nieprzerwanej nici rdzenia DNA, poprzez podobieństwo do sytuacji, w której inna para zasad została wprowadzona do sekwencji DNA po stronie przerwy. Taka sytuacja miała miejsce w cząsteczkowych kompleksach topotekanu interkalującego przerwę DNA w roztworze w badaniu oddziaływań TPT z przerwany dekamery⁹ oraz w krystalicznej strukturze kompleksu DNA – TPT - topo I.⁵³



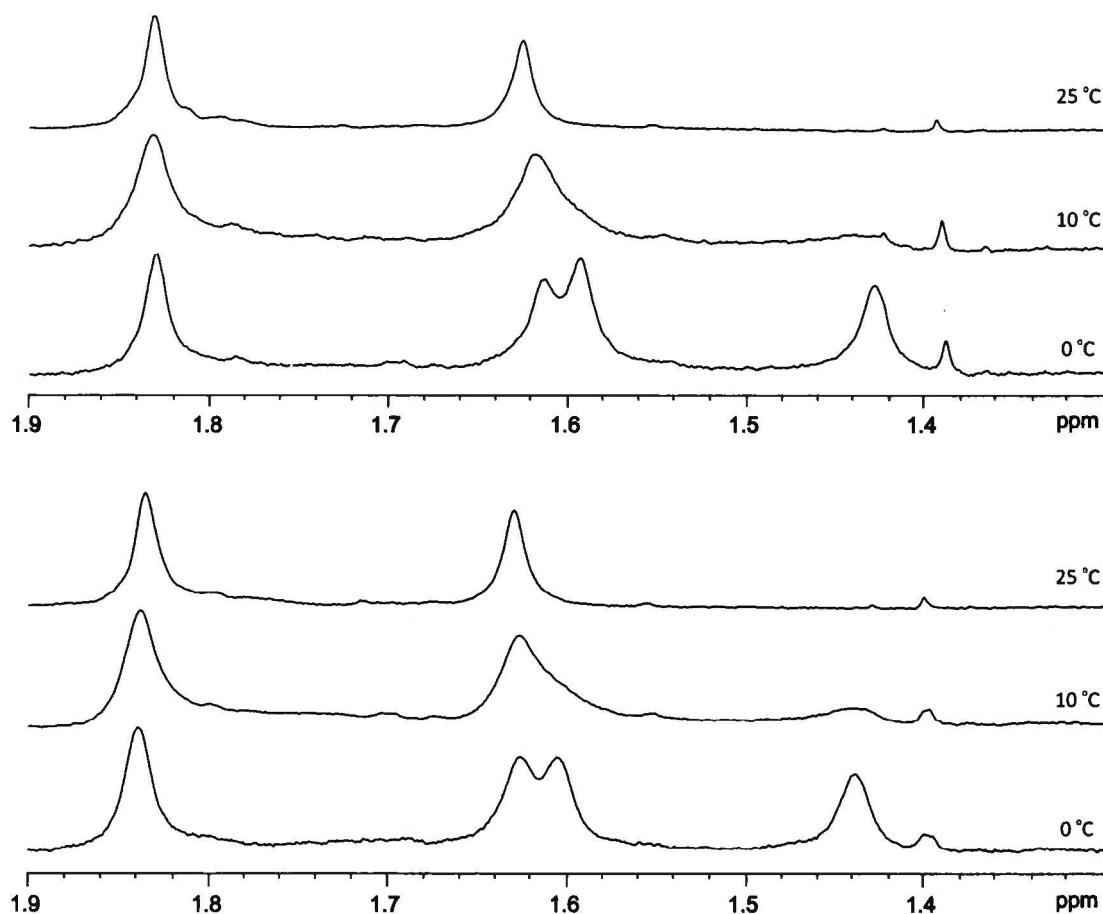
Rysunek 9.14. Możliwe alternatywne sposoby oddziaływania genisteiny z tymidyną w nukleotydzie.

W tym przypadku oddziaływanie typu „stacking” bogatego w elektrony pierścienia A genisteiny z pierścieniem pirymidynowym może być czynnikiem ułatwiającym interkalację. W dalszej części pracy zaprezentowano dowody potwierdzające obecność oddziaływania, z wykorzystaniem eksperymentów PFGSE, które umożliwiają badanie współczynników dyfuzji cząsteczek w roztworze. Sposób oddziaływania badano obserwując zmiany przesunięć chemicznych ^1H i ^{13}C w eksperymentach ^1H -1D, 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQCAD, HMBC oraz 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY.

9.3.2. Wpływ genisteiny na równowagę szpilka – hantla

Jednym z ważniejszych celów tej pracy było zbadanie ewentualnych oddziaływań genisteiny z modelowym dupleksem DNA z dwiema przerwami. Zagadnienie to jest bowiem jednym z najślabiej zbadanych w literaturze. Początkowo prześledziłam wpływ genisteiny na równowagę szpilka – hantla. Jak wcześniej ustalono, przy małym stężeniu nukleotydu w roztworze, *ca* 0.5 mM, oraz niskim stężeniu buforu, 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4 , forma szpilki dominuje. W niższej temperaturze obserwujemy dimeryzację, lecz forma hantli osiąga jedynie 25%. Ponieważ obie formy są w stanie wolnej wymiany (w skali NMR), stwarza to możliwość zbadania wpływu różnych efektów na tę równowagę (schemat 9.1).

Dolny zestaw widm przedstawiony na rysunku 9.15 pokazuje wpływ obniżenia temperatury na równowagę szpilka – hantla w roztworze 0.6 mM (stężenie dotyczy motywu szpilki). Przesunięcia przy 1.61 i 1.84 ppm na widmie zarejestrowanym w 25 °C odpowiadają szpilce. W 0 °C pojawia się drugi zestaw sygnałów pochodzących od grup metylowych tymidyny, przy 1.43 i 1.59 ppm, przypisany strukturze hantli. Obie formy są w stanie wolnej wymiany w stosunku 75 : 25 na korzyść szpilki.



Rysunek 9.15. Wpływ genisteiny (widma górne) na dimeryzację szpilki do hantli (odnośnik, widma dolne) obserwowany przy przesunięciach grup metylowych tymidyny. Roztwór szpilki (widma dolne) nasycono genisteiną (ca 0.5 równoważnika w stosunku do szpilki), widma zarejestrowano w tym samych warunkach (0.6 mM, pH 6, bufor 25/25 mM NaCl/K₃PO₄).

Górny zestaw widm przedstawiony na rysunku 9.15 pokazuje wpływ genisteiny na dimeryzację szpilki DNA. Ślad w 0 °C wskazuje na ca 10% wzrost całki sygnałów tymidyny przy 1.43 i 1.61 ppm, przypisanych strukturze hantli, w wolnej wymianie ze szpilką. Takie same wyniki otrzymano dla wyjściowej genisteiny **1** oraz jej pochodnej **2**. Ten rezultat można zinterpretować jako stabilizujący wpływ genisteiny na tworzenie się hantli. Możliwym wytłumaczeniem jest interkalacja genisteiny do dwóch tymidyn oskrzydających przerwę w pozycjach +1 oraz -1 hantli,

jak przedyskutowano powyżej. Jest to prawdopodobnie sytuacja dynamiczna, w której równowaga $\text{DNA} + \text{Gen} \leftrightarrow \text{DNA} \cdots \text{Gen}$ jest przesunięta w lewo. Taka interkalacja powoduje dodatkową stabilizację hantli, poprzez wzmocnienie interfejsu dimeru (TCGA) przez dwa oddziaływania typu „stacking”.

Następnie podjęto próbę uzyskania informacji dotyczących oddziaływania genisteiny **1** z podwójnie przerwaną hantlą. Genisteina **1** jest bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie przy pH zbliżonym do fizjologicznego. Z tego powodu zwiększono pH roztworu hantli w buforze 200/25 mM NaCl/K₃PO₄ do wartości 8.6 tak, aby w roztworze pojawił się lepiej rozpuszczalny fenolan genisteiny **1**. Zgodnie z pracą Zielonki,¹⁹⁸ genisteinę charakteryzują trzy wartości pKa, przy pH 7.2, 10.0 i 13.1. Z tego powodu, przy pH 8.6 jedna z grup hydroksylowych genisteiny powinna być zjonizowana. W celu zwiększenia rozpuszczalności genisteiny **1**, do roztworu dodano również CD₃OH (18% obj.). Zastosowane stężenie dodekamu (1 mM) jest na tyle niskie, by uzyskać wysoki stosunek genisteina **1**/hantla, a na tyle wysokie, by w temperaturze bliskiej 0°C w badanym układzie obserwować wyłącznie motyw hantli.

Do badania oddziaływań genisteiny **1** z motywem hantli DNA zastosowano metodę PFGSE. Wyniki podano w tabeli 9.5. Dane te wyraźnie dowodzą występowania oddziaływań, co jest dodatkowo potwierdzone na rysunku 9.16. Przy wysokim nadmiarze genisteiny **1** w stosunku do motywu hantli (nr 2 i 3 w tabeli 9.5) współczynnik dyfuzji D_i sygnału protonu 3'-H jest zbliżony do współczynnika dyfuzji czystej genisteiny **1** (nr 1 w tabeli 9.5). Spowodowane jest to obecnością dużej ilości nieskompleksowanej genisteiny **1**, w porównaniu z ilością kompleksu DNA/Gen **1**. Obniżenie wartości pH z 9.2 do 8.4 przy takim samym stosunku DNA/Gen **1** skutkuje zmniejszeniem wartości D_i oraz poszerzeniem sygnału protonu 3'-H (nr 3 w tabeli 9.5 oraz rysunek 9.16c). Obniżając pH, zmniejszamy ilość fenolanu, który najprawdopodobniej słabiej oddziałuje z hantlą DNA, a zwiększamy ilość grup hydroksylowych, co zwiększa ilość kompleksu. Nasuwa się więc wniosek, że grupy hydroksylowe genisteiny są zaangażowane w oddziaływanie z DNA. Potwierdza to wcześniejsze wyniki, wskazujące, że grupa 7-OH wyjściowej genisteiny **1** może być zaangażowana w oddziaływanie z grupą NH skrajnej guanozyny w duplesie d(GDGATCGC)₂.¹⁷² W celu dalszego potwierdzenia tych oddziaływań, zmniejszono ilość genisteiny **1**, co równocześnie zwiększyło udział kompleksu DNA/Gen **1**. Tak jak oczekiwano, wpłynęło to na zmniejszenie D_i do wartości $1.25 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (nr 4 w tabeli 9.5) oraz poszerzenie sygnału protonu 3'-H (rysunek 9.16d). Tabela 9.5 pokazuje również, że genisteina **1** słabo oddziałuje z DNA (wartości K_a). Może to być tłumaczone przez fakt, że niewielka ilość kompleksu

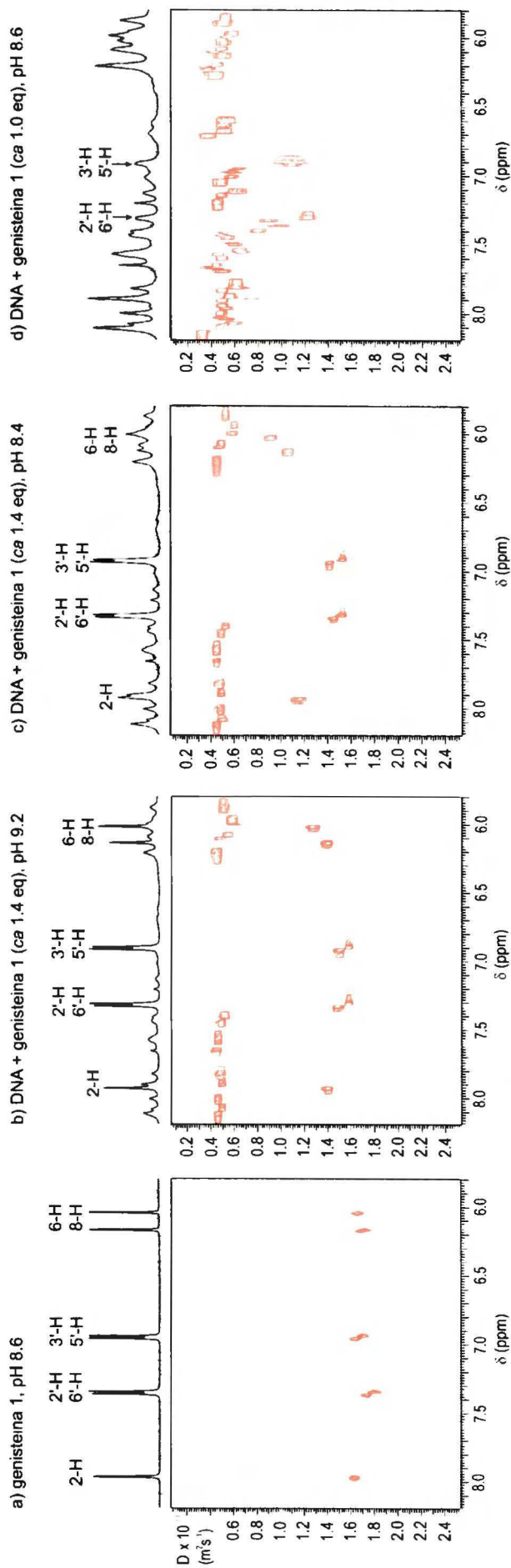
(ca 20%) pozostaje w szybkiej wymianie z nieskompleksowanym DNA, stąd niewielkie zmiany przesunięć chemicznych protonów DNA zaangażowanych w oddziaływanie.

nr	próbka	pH	stężenie [mM]	$D_i(\text{Gen})$ wolna $\times 10^{-10} [\text{m}^2\text{s}^{-1}]$	$D_i(\text{Gen})$ kompleks $\times 10^{-10} [\text{m}^2\text{s}^{-1}]$	$D_i(\text{DNA})$ $\times 10^{-10} [\text{m}^2\text{s}^{-1}]$	K_a [mM ⁻¹] P_{complex}^a	obserwowany sygnał
1	Gen 1	8.6	$C_{\text{Gen1}}, 1.0$	1.75 ± 0.05	-	-		3'-H
2	DNA/Gen1	9.2	$C_{\text{DNA}}, 1.0$ $C_{\text{Gen1}}, 1.4$	-	1.53 ± 0.05	0.45 ± 0.05 -	0.31 0.17	T-1 CH ₃ 3'-H
3	DNA/Gen1	8.4	$C_{\text{DNA}}, 1.0$ $C_{\text{Gen1}}, 1.4$	-	1.45 ± 0.05	0.46 ± 0.05 -	0.57 0.23	T-1 CH ₃ 3'-H
4	DNA/Gen1	8.6	$C_{\text{DNA}}, 1.0$ $C_{\text{Gen1}}, 1.0$	-	1.25 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.77 0.38	T-1 CH ₃ 3'-H
5	DNA	8.6	$C_{\text{DNA}}, 1.0$	-	-	0.45 ± 0.05	-	T-1 CH ₃
6	Gen3	6.0		1.51 ± 0.05^b	-	-	0.15 ^c	3'-H
7	DNA/Gen3	6.0	$C_{\text{DNA}}, 1.0$ $C_{\text{Gen3}}, 1.0$	-	0.98 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.71 ^d 0.50	T-1 CH ₃ 3'-H

Tabela 9.5. Wyniki eksperymentów PFGSE oddziaływań genisteiny 1 i pochodnej 3 z motywem hantli DNA. Próbkę badano w buforach wodnych 200/25 mM NaCl/K₃PO₄, 18% CD₃OH, w 2°C w podanym pH.

- Populacja kompleksu, ułamek molowy;
- Współczynnik dyfuzji w nieskończonym rozcieńczeniu;
- Stała autoasocjacji genisteiny 3 z eksperymentu dyfuzyjnego wykonanego techniką PFGSE;
- Stała asocjacji obliczona z uwzględnieniem autoasocjacji genisteiny 3.

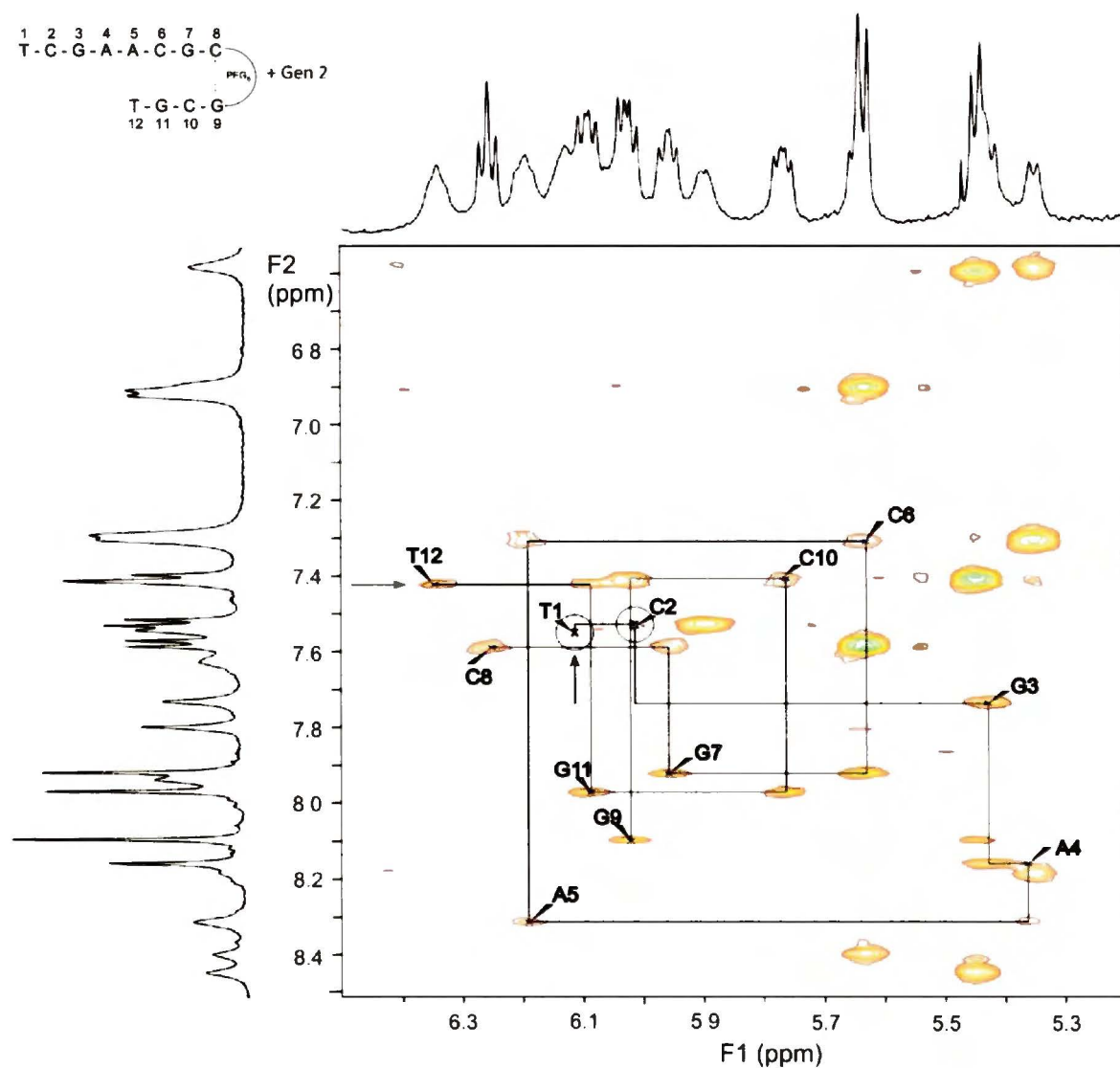
Przedstawione wyniki zgadzają się z analizami biologicznymi, wskazującymi na inhibicję topo II przez genisteinę. Wiązanie genisteiny w obu przerwach zapobiega religacji obu nici DNA i dlatego blokuje działanie topo II.



Rysunek 9.16. Zależność współczynników dyfuzji genisteiny **1** od pH i nadmiaru molowego względem hantli DNA w 0°C w buforze H₂O 200/25 mM NaCl/K₃PO₄ z dodatkiem CD₃OH (18 % obj.).

9.3.3. Oddziaływanie pochodnej 2 z motywem szpilki DNA

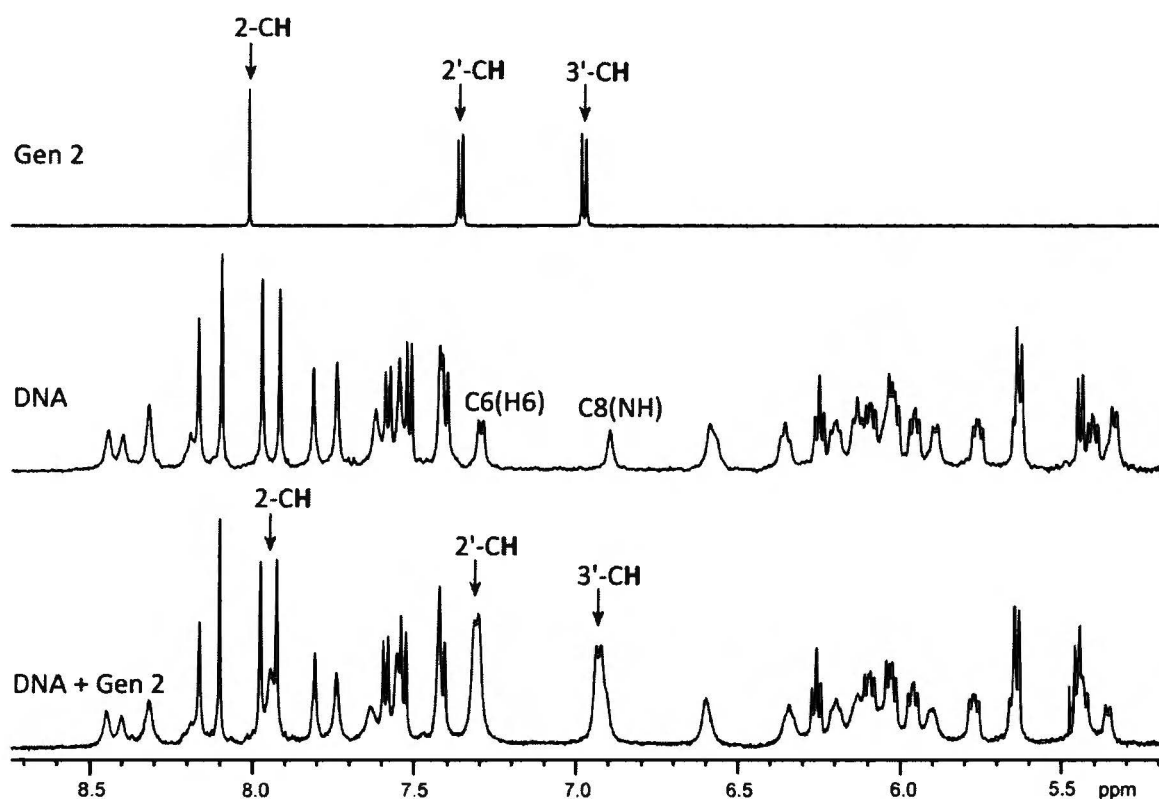
Kolejnym etapem było zbadanie oddziaływania motywu szpilki DNA z pochodną genisteiny 2. Celem było stwierdzenie, czy oddziaływania pochodnych genisteiny ze szpilką i hantłą różnią się. Obserwacje prowadzono w 25°C, ponieważ w tej temperaturze jest obecna tylko jedna forma DNA, co umożliwia interpretację zmian przesunięć chemicznych. Przewidywano, że tymidyny T-1 i T-12 będą głównym celem wiązania pochodnej genisteiny 2, zgodnie z analizami biologicznymi.³ Na rysunku 9.17 pokazano fragment „fingerprint” widma NOESY motywu szpilki z nadmiarem pochodnej genisteiny 2 (ca 1.5 równoważnika).



Rysunek 9.17. Fragment „fingerprint” widma NOESY szpilki DNA w 25°C, 0.4 mM, pH 6.1, w buforze 25/25 mM NaCl/K₃PO₄ w obecności 1.5 równoważnika pochodnej genisteiny 2. Brakujące sygnały oznaczono czarnymi kółkami. Początek i koniec sekwencji oznaczono strzałkami.

Zaobserwowano nieznaczne zmiany przesunięć sygnałów DNA i brak sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonami 2-CH, 2'-CH, 3'-CH pochodnej **2**, a protonami DNA w temperaturze pokojowej.

Na projekcji widma NOESY szpilki DNA w obecności Gen **2** (rysunek 9.18, widmo dolne) widoczny jest szeroki sygnał przy 7.92 ppm, przypisany protonowi 2-CH pochodnej **2**, który dla czystej Gen **2** jest wąskim singletem przy 8.04 ppm (widmo górne). Ten sam trend obserwujemy dla protonów 2'-CH oraz 3'-CH, które są przesunięte w stronę niższych częstotliwości o, odpowiednio, 0.12 i 0.10 ppm. Obserwowana różnica przesunięć wskazuje na interkalację pochodnej **2** do zasad DNA, a poszerzenie może być spowodowane pośrednią szybkością wymiany z DNA. Poszerzenie to wyklucza także możliwość obserwacji sygnałów korelacyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych.

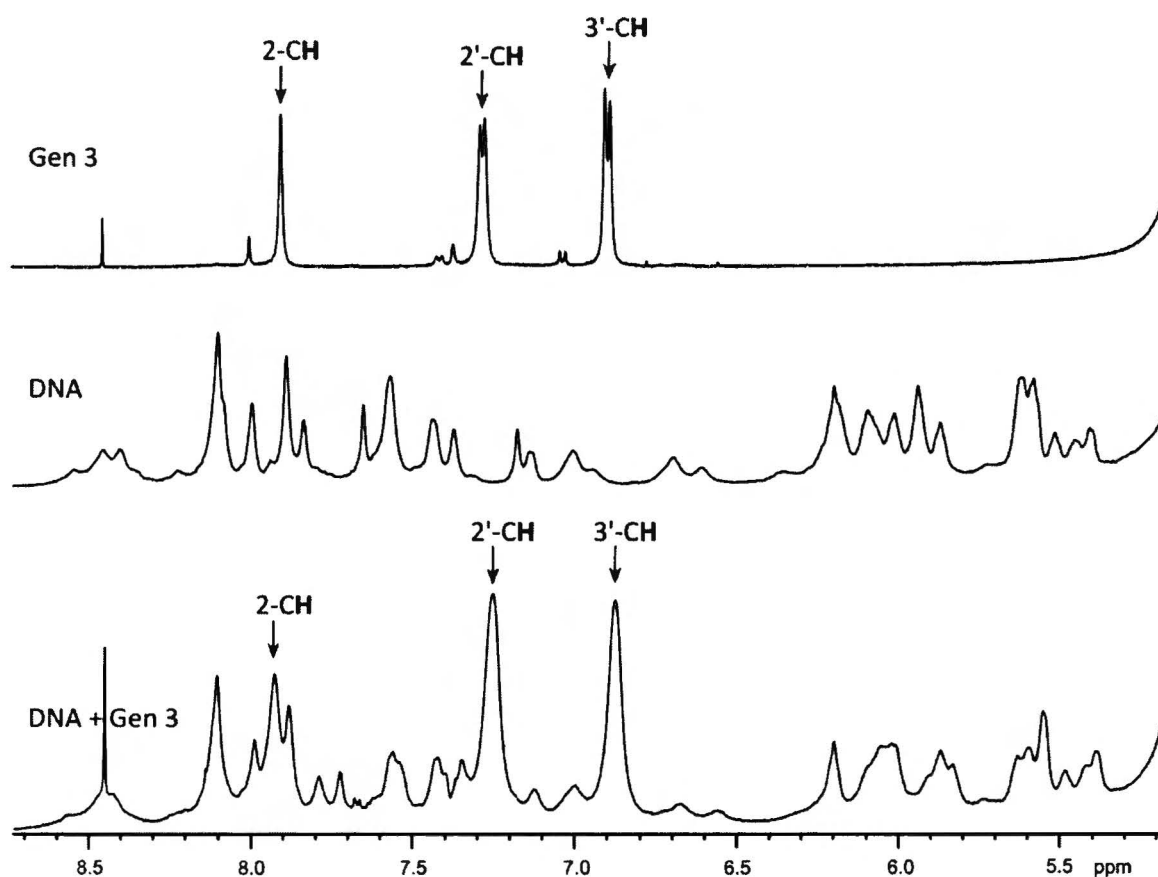


Rysunek 9.18. Identyfikacja sygnałów pochodnej genisteiny **2** na widmie szpilki DNA i Gen **2** w 25°C (widmo dolne), w porównaniu z widmem czystej pochodnej **2** (widmo górne) i czystego DNA (widmo środkowe). Protony 2'-CH i 3'-CH pochodnej **2** pokrywają się z sygnałami DNA, odpowiednio, C3(H6) i C5(NH).

9.3.4. Oddziaływanie pochodnej **3** z motywem hantli DNA

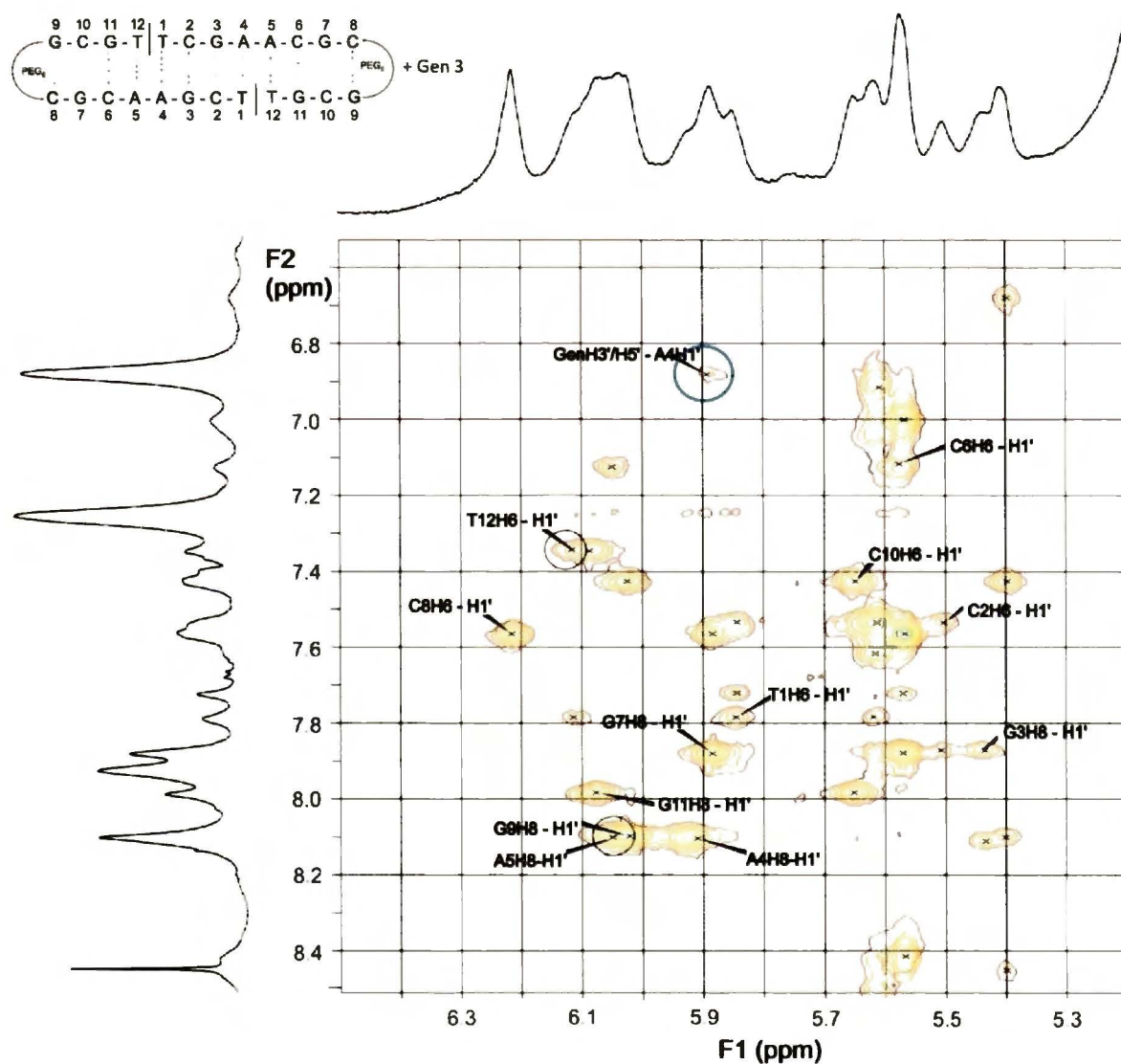
Z trzech badanych związków, najlepiej rozpuszczalna w wodzie jest pochodna **3**, zawierająca dwie grupy dimetyloaminowe. Możliwe jest więc uzyskanie układu zawierającego jedynie motyw hantli i jednocześnie molowy nadmiar pochodnej **3**. Z tego powodu badanie jej oddziaływań z hantlą DNA umożliwia zebranie bardziej szczegółowych informacji, mimo że w zasadzie jedynym źródłem jest widmo NOESY (poszerzenie sygnałów w 2°C uniemożliwia rejestrację dobrych widm TOCSY i HSQC).

Na projekcji widma NOESY motywu hantli i pochodnej **3** (rysunek 9.19, widmo dolne) sygnały Gen **3** są poszerzone w porównaniu z sygnałami samej pochodnej **3**. Przesunięcia chemiczne protonów genisteiny praktycznie nie zmieniają się.

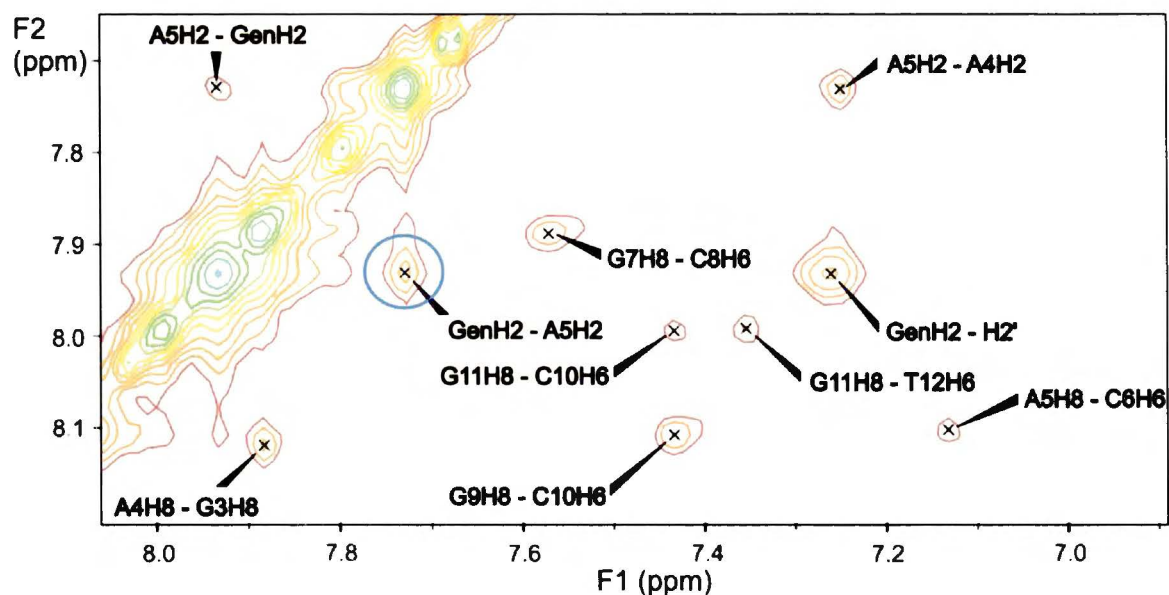


Rysunek 9.19. Identyfikacja sygnałów pochodnej genisteiny **3** na widmie hantli DNA i Gen **3** w 2°C (widmo dolne), w porównaniu z widmem czystej pochodnej **3** (0°C, widmo górne) i czystego DNA (widmo środkowe).

Na widmie NOESY motywu hantli DNA w obecności 2 równoważników pochodnej **3**, wykonanym w 2°C, widoczne są międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne pomiędzy protonem 3'-H genisteiny **3**, a protonem H1' guanozyny 7 (rysunek 9.19) oraz protonem 2-H genisteiny **3**, a protonem H2 adeniny 5 (rysunek 9.20). Przesunięcia chemiczne motywu hantli podano w tabeli 9.6, natomiast przesunięcia genisteiny **3** samej oraz w obecności dodekameru w tabeli 9.7.



Rysunek 9.19. Fragment „fingerprint” widma NOESY hantli DNA w 2°C, 1.9 mM, pH 6.1, w buforze 200/25 mM NaCl/K₃PO₄, 15% CD₃OH w obecności 2 równoważników pochodnej genisteiny **3**. Międzycząsteczkowy sygnał korelacyjny zaznaczono niebieskim, a brakujące sygnały czarnym kółkiem.



Rysunek 9.20. Fragment widma NOESY hantli DNA w 2°C, 1,9 mM, pH 6,1, w buforze 200/25 mM NaCl/K₃PO₄, 15% CD₃OH w obecności 2 równoważników pochodnej genisteiny **3**. Międzyzwiązkowy sygnał korelacyjny zaznaczono niebieskim kółkiem.

zasada	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5', H5''	H6/8	H2/5/Me	NH ₂	NH
T1	5.85	2.08	2.39	4.67	4.07	na*	7.79	1.60	-	13.58
C2	5.50	1.95	2.32	4.81	na	na	7.55	5.61	6.91; 8.56	-
G3	5.44	na	na	4.97	4.30	4.00	7.88	-	na	12.64
A4	5.92	na	na	na	4.41	na	8.12	7.25	na	-
A5	6.05	2.57	na	5.00	4.40	na	8.10	7.73	na	-
C6	5.57	1.78	2.21	4.77	na	na	7.13	5.18	6.58; 8.09	-
G7	5.88	2.59	na	na	4.26	na	7.89	-	na	13.08
C8	6.21	2.33	2.45	4.85	4.20	na	7.57	5.57	7.01; 8.43	-
G9	6.02	na	na	4.97	4.34	3.87	8.11	-	na	13.25
C10	5.65	2.19	2.45	4.87	4.22	na	7.43	5.40	6.69; 8.47	-
G11	6.08	na	na	5.02	4.43	4.16; 4.22	7.99	-	na	13.02
T12	6.11	2.34	na	4.94	4.26	na	7.35	1.43	-	13.75

Tabela 9.6. Przesunięcia chemiczne ¹H (ppm) motywu hantli w 2°C, 1,9 mM, pH=6, w buforze H₂O 200/25 mM NaCl/K₃PO₄, 15% CD₃OH w obecności 2 równoważników pochodnej genisteiny **3**; *nie przypisane (not assigned).

2-H	2'-H	3'-H	6-CH ₂	8-CH ₂	NMe ₂
7.78	7.21	6.83	4.17	4.15	2.82
7.93	7.26	6.89	4.20	4.27	2.84

Tabela 9.7. Przesunięcia chemiczne (ppm) pochodnej genisteiny **3** samej (górze) i w obecności ½ równoważnika hantli DNA (dolne); pH=6, bufor H₂O 200/25 mM NaCl/K₃PO₄, 15% CD₃OH.

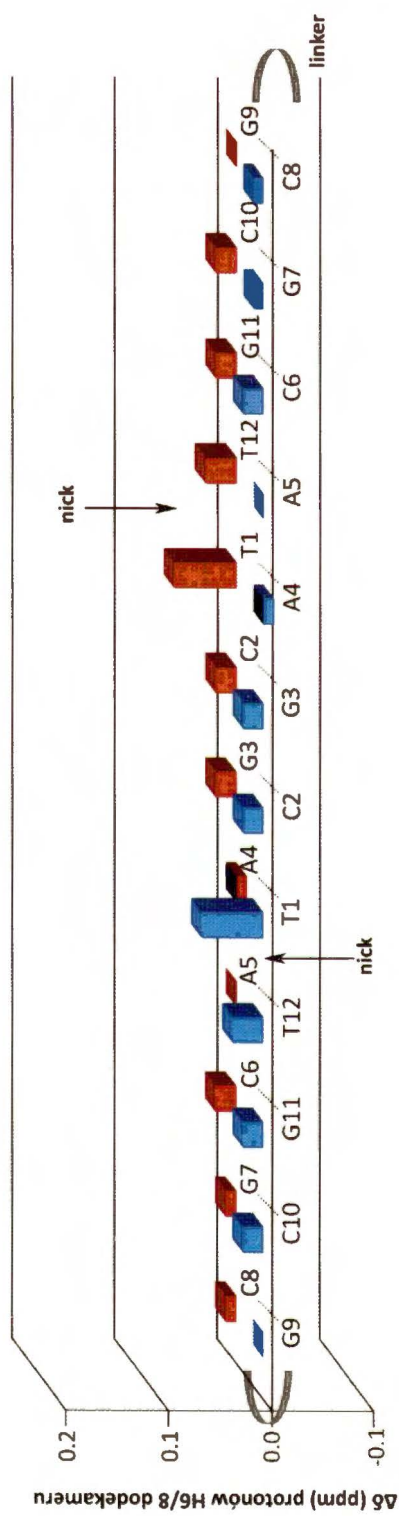
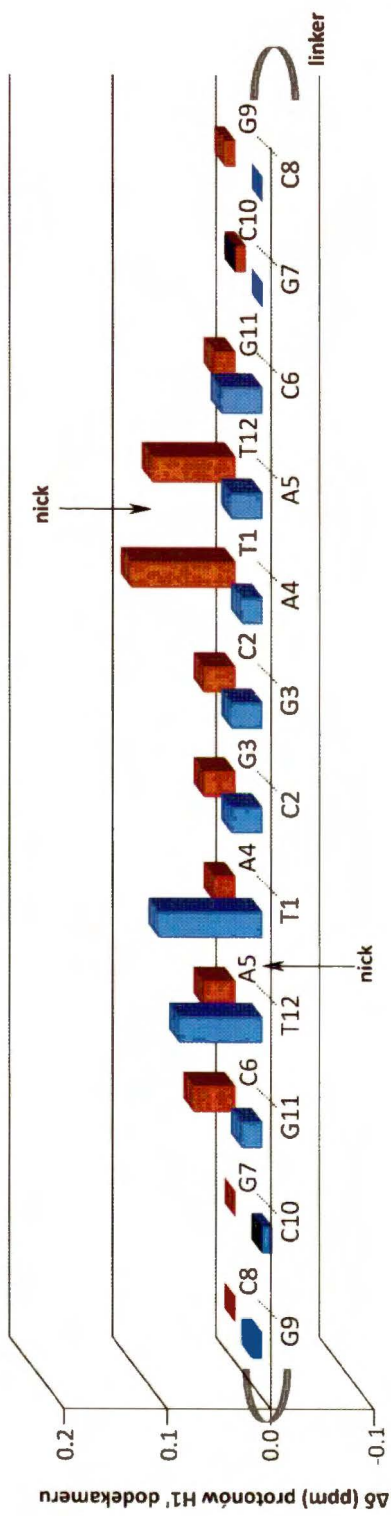
Zmiany przesunięć chemicznych protonów hantli DNA w obecności genisteiny **3** w porównaniu z przesunięciami samej hantli w takich samych warunkach nie przekraczają 0.2 ppm. Na widmie wciąż widoczny jest jeden zestaw sygnałów, co sugeruje, że badany układ jest w dalszym ciągu symetryczny. Różnice przesunięć protonów H1' i H6/H8 DNA pokazano na rysunku 9.21. Widać, że w przypadku tych protonów różnice są mniejsze niż 0.1 ppm, a największe wartości występują w pobliżu przerw „nick”. Może to sugerować, że genisteina **3** oddziałuje z hantlą DNA poprzez interkalację w przerwie.

Analiza widma przy większej intensywności sygnałów umożliwia obserwację w sumie 13 sygnałów korelacyjnych, które wymieniono w tabeli 9.8. Sygnały te występują pomiędzy protonami 2' i 3'-H genisteiny **3** a protonami H1', H4', Me i H2 reszt nukleotydowych otaczających przerwę: A4, A5, T1 i T12. Jest to więc kolejny dowód przemawiający za możliwym oddziaływaniem pochodnej genisteiny w przerwie „nick”.

Wykorzystując sygnały korelacyjne z widma NOESY mieszaniny dodekameru i pochodnej **3**, wykonanego w 0°C (rysunek 9.19 i 9.20), podjęto próbę obliczenia struktury hantli i oddziałującej z nią pochodnej **3** metodami dynamiki molekularnej. Z otrzymanych struktur wybrano cztery o najniższej energii, oznaczone numerami 48-2, 48-20, 49-13 i 49-2 (rysunek 9.22).

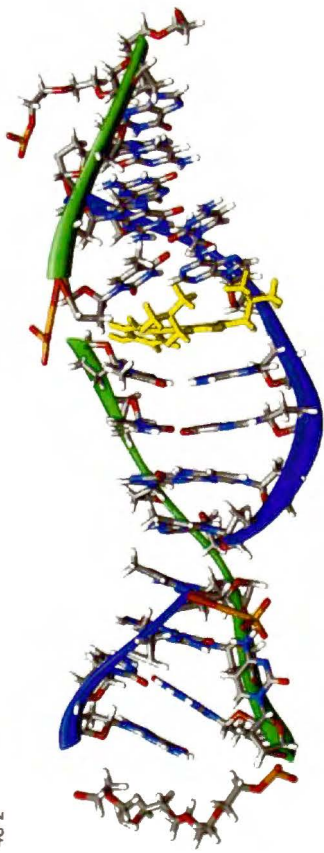
numer struktury	48-2	48-20	49-13	49-2
odległości (Å)				
A4 H1' - Gen 2'-H	5.56	4.34	4.92	4.72
A4 H1' - Gen 3'-H	7.51	5.49	6.48	6.25
T1 H1' - Gen 2'-H	3.03	4.34	2.41	2.43
T1 H1' - Gen 3'-H	3.50	2.60	3.58	4.01
A5 H1' - Gen 2'-H	5.65	5.45	6.81	3.62
T12 H4' - Gen 2'-H	6.40	7.84	8.37	8.49
T12 H4' - Gen 3'-H	7.19	6.02	6.56	7.96
T1 H4' - Gen 2'-H	3.09	6.23	4.18	4.17
A4 H4' - Gen 2'-H	8.42	7.47	7.86	7.88
A4 H4' - Gen 3'-H	9.94	8.24	8.87	8.88
T1 Me - Gen 2'-H	7.00	5.28	7.25	7.65
T1 Me - Gen 3'-H	8.65	6.27	9.28	9.77
A5 H2 - Gen 2'-H	4.01	5.60	6.69	4.19

Tabela 9.8. Odległości między protonami hantli DNA i pochodnej genisteiny **3**, dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne, wyznaczone w programie *Chimera*.

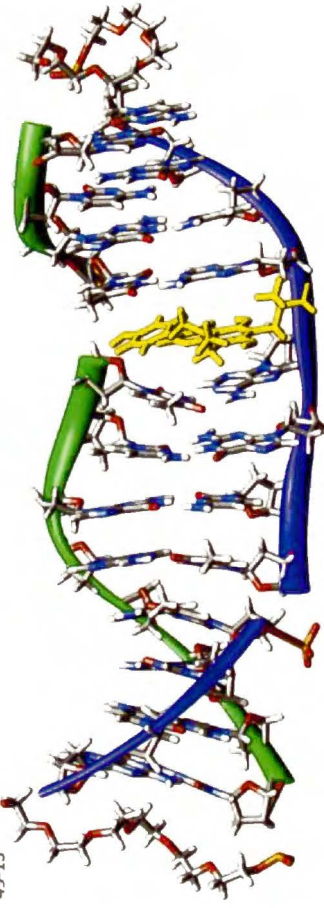


Rysunek 9.21. Zmiany przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{dodekamer}) - \delta(\text{dodekamer/genisteina } \mathbf{3})$ dla protonów H1' (na górze) i protonów H6/8' (na dole) w dodekamerze w obecności pochodnej genisteiny **3**. Strzałkami zaznaczono przerwy „nick”.

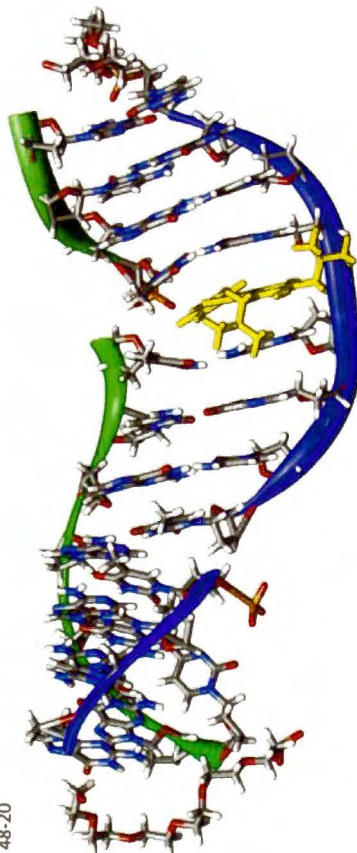
48-2



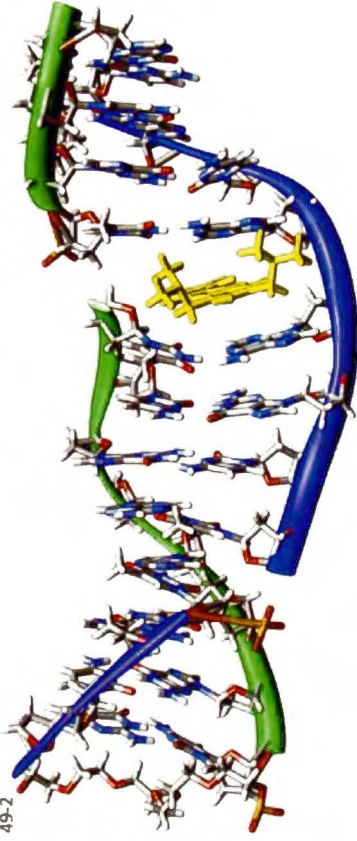
49-13



48-20



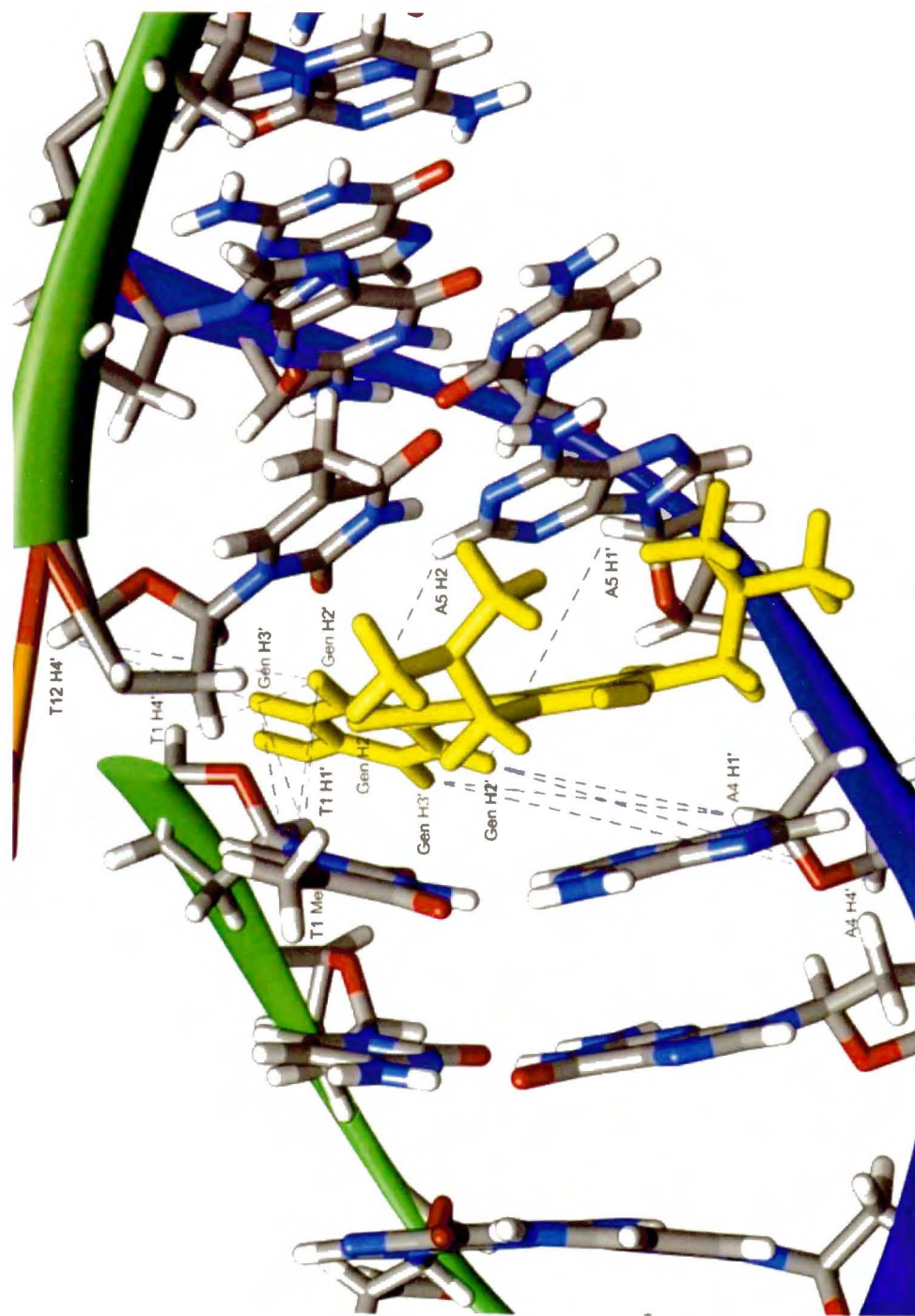
49-2



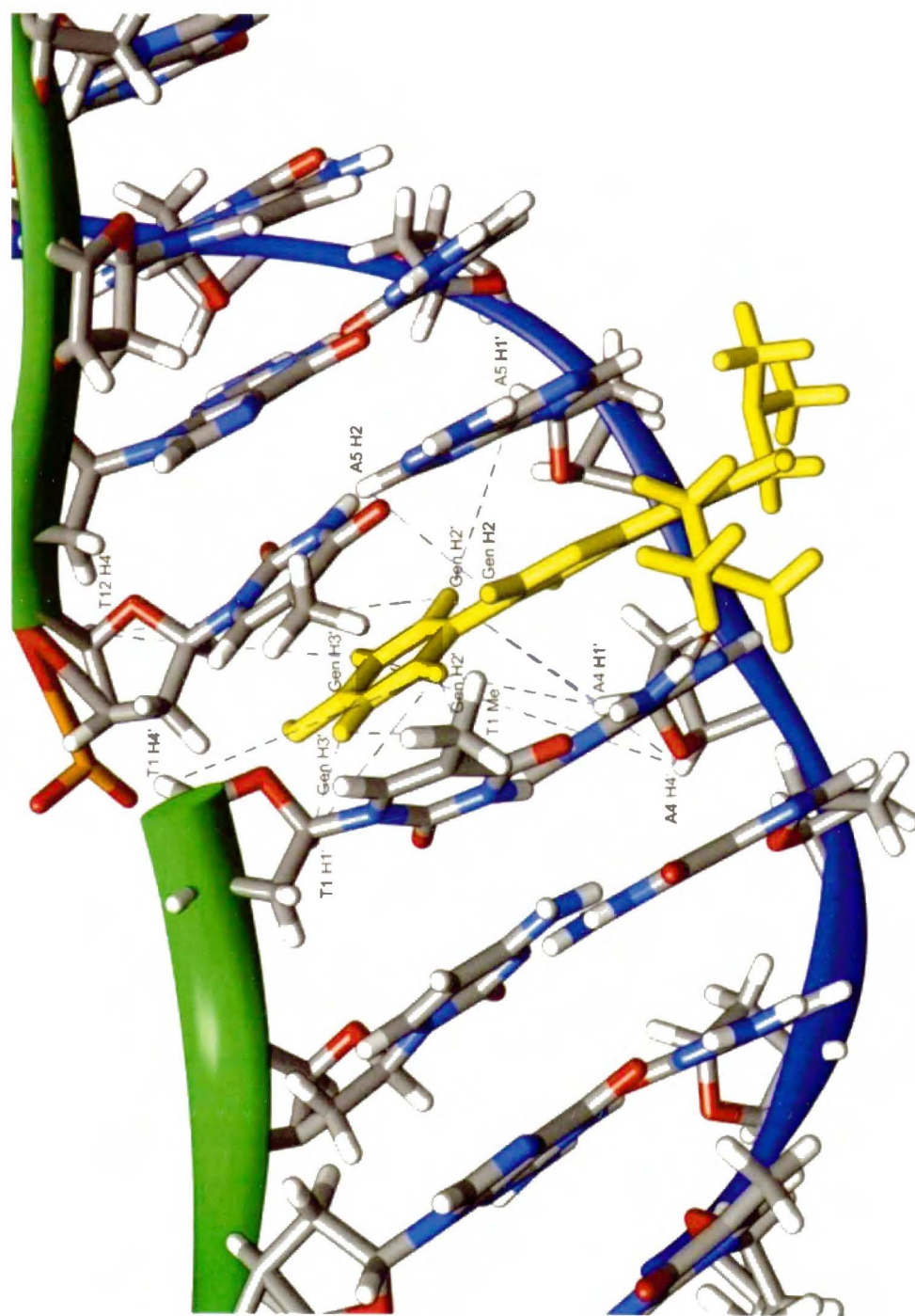
Rysunek 9.22. Obliczone struktury pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA i oddziałującej z nią cząsteczką genisteiny **3**.

We wszystkich czterech strukturach genisteina **3** interkaluje od strony przerwy (tylko jednej) pomiędzy dwie adenozyiny (A4 i A5). Powoduje to rozsuniecie się od siebie sparowanych z adenozyinami tymidyn (odpowiednio, T1 i T12) i rozsynchronizowanie hantli. Desynchronizacja ta nie jest jednak widoczna w zmianie przesunięć chemicznych protonów w dodekamerze. Prawdopodobnie spowodowane jest dynamiką całej struktury, a w szczególności szybkością wymiany oraz słabym wiązaniem.

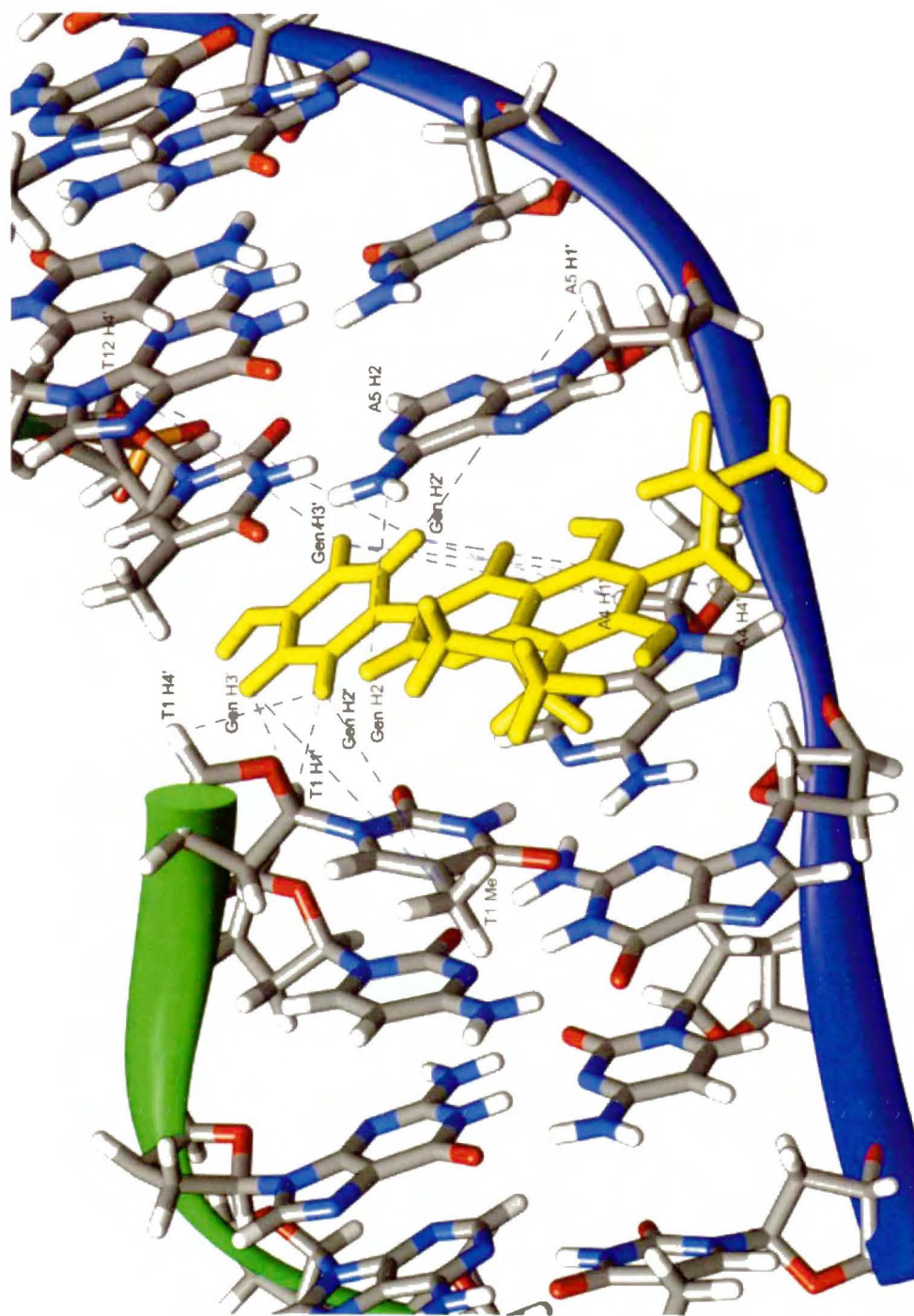
Główną różnicą między czterema strukturami jest głębokość interkalacji genisteiny **3** oraz stopień zaburzenia regularnej helisy. Stosunkowo najmniej zmieniona wydaje się być helisa 48-2, a najbardziej helisy 48-20 i 49-13. W tabeli 9.8 pokazano odległości między protonami dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne na widmie NOESY, wyznaczone dla wszystkich czterech struktur. Fragmenty obrazujące odległości i różnice pomiędzy strukturami pokazano na rysunkach 9.23 – 9.26. Wszystkie te odległości są mniejsze od 10 Å. Dla struktury 49-2 sześć wartości jest mniejszych niż 5 Å, dla struktur 48-2 i 49-13 są to cztery wartości, a dla struktury 48-20 tylko trzy. Nie podano wartości parametrów helikalnych dla obliczonych struktur, ponieważ ich dokładność jest zdecydowanie mniejsza niż dokładność struktury samej hantli. Wynika to z niewielkiej ilości więzów eksperymentalnych pomiędzy genisteiną **3** a DNA.



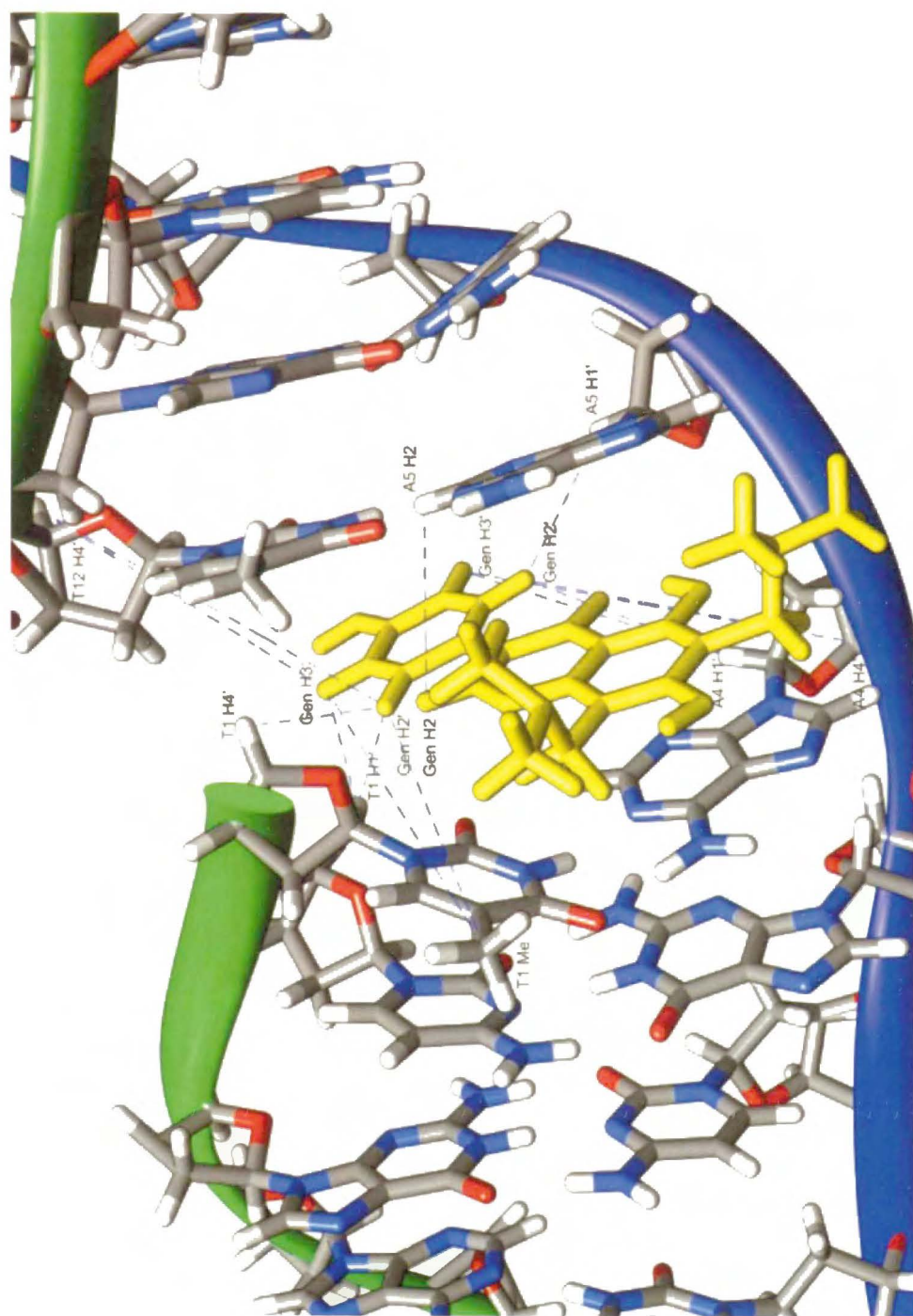
Rysunek 9.23. Fragment struktury 48-2 pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA i oddziałującej z nią cząsteczki pochodnej **3**. Przerywanymi liniami zaznaczono odległości między atomami, dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne.



Rysunek 9.24. Fragment struktury 48-20 pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA i oddziałującej z nią cząsteczki pochodnej 3. Przerwanymi liniami zaznaczono odległości między atomami, dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne.



Rysunek 9.25. Fragment struktury 49-13 pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA i oddziałującej z nią cząsteczki pochodnej **3**. Przerwanymi liniami zaznaczono odległości między atomami, dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne.



Rysunek 9.26. Fragment struktury 49-2 pojedynczej cząsteczki hantli dodekameru DNA i oddziałującej z nią cząsteczki pochodnej **3**. Przerwanymi liniami zaznaczono odległości między atomami, dającymi międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne.

10. Podsumowanie

topo I

- 1) W części pracy poświęconej zagadnieniom inhibicji topoiizomerazy I scharakteryzowano struktury i stabilność form topotekanu w różnych układach (woda, metanol, DMSO). Pokazano również, że TPT w roztworach wodnych w niskich temperaturach (ca 5°C) istnieje w formie agregatów o czasach korelacji charakterystycznych dla dużych cząsteczek, lecz daje zerowe wzmocnienia NOE, zarówno w wodzie, jak i w układzie DMSO-*d*₆/CDCl₃ w temperaturze pokojowej.
- 2) Chlorowodorek TPT jest niestabilny w roztworach metanolu i ulega dwóm procesom, tj. substytucji grupy Me₂NH⁺, prowadzącej do powstania eteru 23-CH₂-OMe oraz pojawienia się przejściowej formy enamino-enolu w obrębie pierścieni C/D, na co wskazuje deuterowanie grupy 5-CH₂. Jest to pierwszy eksperymentalny dowód występowania formy, która została wcześniej przewidziana teoretycznie. Obecność w DMSO-*d*₆ dwóch soli TPT: *N*-dimetyloamoniowej i *N*-trimetyloamoniowej w postaci triflanów, umożliwia zaobserwowanie faktu, że ta ostatnia jest znacznie bardziej podatna na substytucję. Wyniki pokazujące niestabilność TPT w roztworach metanolu wyjaśniają obserwowany rozpad topotekanu w homogenatach tkanek serca przechowywanych w metanolu w temperaturze pokojowej przez dłuższy czas,¹⁹⁹ oraz wskazują, że mierzone w metanolu stężenia TPT podawanego pacjentom mogą być fałszywe.
- 3) Alkilowanie obojętnego topotekanu odczynnikami CF₃SO₃Me prowadzi do związków 10-*O*/20-*O* i 22-*N*-metylowanych, w tym również metylowanych podwójnie. Nie udało się otrzymać czwartorzędowej pochodnej z przeciwanionem I⁻. Pochodne z podstawnikami ²³CH₂-OMe i ²³CH₂-OH otrzymano poprzez reakcję odpowiednio, chlorowodoru TPT w MeOH oraz czwartorzędowej pochodnej TPT w DMSO. Zbadano również oddziaływanie czwartorzędowej pochodnej TPT z DNA. Okazało się, że naświetlanie czwartorzędowej pochodnej TPT światłem z zakresu bliskiego nadfioletu prowadzi do powstawania związku typu QM, który kowalencyjnie przyłącza się do nici DNA (zarówno podwójnej, jak i pojedynczej). Alkilowanie to nie przebiega w sposób selektywny, o czym świadczą szerokie sygnały na widmach NMR.

topo II

- 1) W części pracy dotyczącej zagadnień inhibicji topoiizomerazy II zaprojektowano i scharakteryzowano dodekamer DNA, którego dupleks może być modelowym związkiem do badania oddziaływań pomiędzy DNA a inhibitorami topo II. Dupleks ten zawiera dwie przerwy typu „nick”, które naśladują wynik działania topoiizomerazy II na podwójną nić DNA. Scharakteryzowane zostały motywy szpilki i hantli tego dodekameru oraz wpływ takich czynników jak temperatura, stężenie i siła jonowa na występującą między nimi równowagę. Prześledzono także wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego na stan równowagi i zmianę wartości przesunięć chemicznych. Wyznaczenie przesunięć chemicznych motywu hantli umożliwiło obliczenie struktury dodekameru. Okazało się, że w zastosowanych warunkach (H_2O/D_2O (9:1), $0^\circ C$, 3.5 mM, pH 6, 25/25 mM NaCl/ K_3PO_4), dodekamer przyjmuje formę B-helisy, z niewielkimi odchyleniami w sąsiedztwie przerwy. Na podstawie powyższych badań udało się uzyskać układ, dla którego w $0^\circ C$ forma hantli dominuje w roztworze przy stężeniu rzędu 1 mM (bufor H_2O , pH 6, 25/200 mM K_3PO_4 / NaCl, 15% CD_3OH). Umożliwia on obserwację oddziaływań pomiędzy pochodną genisteiny a DNA.
- 2) Udało się uzyskać pochodne genisteiny o lepszej, w porównaniu z genisteiną, rozpuszczalności w medium fizjologicznym. Pochodne te zostały zsyntetyzowane i scharakteryzowane przez A. Misior i R. Kawęckiego.²⁰⁰
- 3) Zbadano także oddziaływanie genisteiny jako związku macierzystego. Okazało się, że dodatek genisteiny wpływa na równowagę szpilka – hantla. Rezultaty wskazują na stabilizujące działanie genisteiny na tworzenie się hantli. Stabilizacja może być spowodowana interkalacją genisteiny do dwóch tymidyn sąsiadujących z przerwą „nick”. Występowanie oddziaływań pomiędzy genisteiną a DNA potwierdzają też badania współczynnika dyfuzji, z których wynika, że w oddziaływanie z DNA mogą być zaangażowane grupy hydroksylowe genisteiny. Następnie badano oddziaływanie DNA z pochodnymi o coraz większej rozpuszczalności. Na podstawie badań współczynników dyfuzji wyznaczono stałe asocjacji genisteiny **1** i **3** w kompleksie z DNA. Prześledzono też oddziaływania pomiędzy DNA i pochodną **3**, o których świadczą międzycząsteczkowe sygnały korelacyjne widoczne na widmie NOESY. Na podstawie tych sygnałów korelacyjnych, obliczone zostały struktury hantli z oddziałującą z nią pochodną Gen **3**. W strukturach tych genisteina **3** interkaluje od strony przerwy pomiędzy dwie adenozyne (A4 i A5). Powoduje to rozsuniecie się od siebie sparowanych z adenozynami tymidyn (odpowiednio, T1 i T12). Uzyskanie struktury związku z grupy flawonoidów oddziałującego z motywem DNA nie ma precedensu w literaturze. Uzyskane wyniki zgadzają się z analizami biologicznymi, wskazującymi na inhibicję topo II przez genisteinę.

10. Część eksperymentalna

10.1. Aparatura

Widma NMR zostały zarejestrowane na spektrometrach:

1. Varian INOVA 500 MHz wyposażony w sondę ID, Narodowy Instytut Leków, Warszawa;
2. Bruker AM 500 MHz, IChO PAN, Warszawa;
3. Varian 600 MHz, IChO PAN.

Pomiary stężenia oligomerów DNA wykonywano na aparatach:

1. UV-Vis Carry 1E, IChO PAN;
2. Jasco V-670, IChO PAN.

Pomiary MS wykonywano na aparatach:

1. Mariner Biospectrometry Workstation, PerSeptive Biosystems, IChO PAN;
2. 400QTRAP, Applied Biosystems, IChO PAN;
3. Voyager-Elite MALDI, PerSeptive Biosystems, CBMiM PAN, Łódź.

Eksperymenty naświetlania UV wykonywano za pomocą lampy UV Spectroline 15 W.

10.2. Eksperymenty NMR

Aby zarejestrować widma NMR, próbki rozpuszczano w następujących układach: H₂O + D₂O 10%v, H₂O + CD₃OH 15%v, DMSO-*d*₆ lub CD₃OD. Pomiary wykonywano w probówkach 5 mm. Jako wzorzec wewnętrzny stosowano TSP-*d*₄ (0.0 ppm) lub DMSO-*d*₆ (2.49 ppm). Widma NMR rejestrowano w temperaturach: 0, 2, 10, 20, 30°C. Eksperymenty zostały zarejestrowane w następujący sposób:

¹H NMR

Widma wykonano wykorzystując standardową metodę presaturacji resztkowego sygnału wody (oprogramowanie Varian).

DPFGSE NOE

Widma zarejestrowano z użyciem sekwencji opublikowanej przez Stotta²⁰¹ z wykorzystaniem impulsów kształtowanych, wygenerowanych przez oprogramowanie Varian. Impuls rsnob π kalibrowano indywidualnie dla każdego multipletu.

DPFGSE ROE

Widma zarejestrowano z użyciem programu otrzymanego od W. Koźmińskiego (Uniwersytet Warszawski), wykorzystującym impulsy kształtowane π (kształt rsnob, selektywność 50 Hz, czas trwania *ca* 30 ms). „Spin lock field” 3 kHz, w trybie cw, o czasie trwania 500 ms (czas mieszania) ustawiono na środku sygnału wody.

1D NOE

Widma zarejestrowano stosując naświetlanie każdego multipletu przez 15 s, przy szerokości spektralnej (ang. *spectral width*) $sw = 6$ kHz, czasie akwizycji (ang. *acquisition time*) $at = 2$ s i 300 powtórzeniach. Widma w trybie absorpcyjnym analizowano poprzez porównanie z widmem „dummy irradiation” i z uwzględnieniem czynnika nasycenia 0.6 – 0.9.

DPFGSE NOESY

Widma zarejestrowano z użyciem metody States-TPPI^{202, 203} z tłumieniem sygnału wody. Stosowano następujące parametry: czas mieszania 150 ms, czas powtórzenia (ang. *recycle delay*) = 2 s, 2048 x 512 punktów z 64 powtórzeniami na inkrement. Przed transformacją Fouriera zastosowano procedurę uzupełniania zerami (ang. *zero filling*) tak, aby uzyskać macierz 4K x 4K. Dla obu wymiarów zastosowano apodyzującą funkcję „shifted squared sine bell”.

TOCSY

Widma TOCSY^{204, 205} zarejestrowano jako WGTOCSY z selektywnym impulsem „one-lob sinc” i procedurą flipback. Czas mieszania wynosił 80 ms z DIPSI-2-spin-lock field 8 kHz. Widma ¹H NMR na spektrometrach Varian 500 i 600 MHz w H₂O rejestrowano, odpowiednio, przy $sw = 12$ i 16 kHz, z wykorzystaniem sekwencji WATERGATE do wygaszenia wody (impulsy 1 - 2 ms).

¹H/¹³C-HSQCAD

Widma otrzymano stosując $sw = 5$ kHz, 2048 punktów pomiarowych w wymiarze ¹H oraz 8 kHz i 800 x 2 inkrementów w wymiarze ¹³C, ze 128 powtórzeniami na inkrement t_1 , zwłoka relaksacyjna (ang. *relaxation delay*) $d1 = 1$ s, a stała sprzężenia ¹J (C,H) = 135 Hz. Przed transformacją Fouriera dane zostały liniowo uzupełnione do 1600 punktów, zastosowano też procedurę uzupełniania zerami do 4096 punktów w wymiarze F₁.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC

Widma ^1H - ^{13}C HMBC z wybranym gradientem rejestrowano przy następujących parametrach: $t_1 = 0.2$ s, szerokość impulsu ^1H - 90° (ang. *pulse width*) $\text{pw} = 7.8$ μs , szerokość impulsu ^{13}C - 90° $\text{pw} = 11.5$ μs , $\text{sw} = 5$ kHz i 2048 punktów pomiarowych w wymiarze ^1H oraz 2.5 kHz i 1024 inkreментy w wymiarze ^{13}C , $d_1 = 1.2$ s. Dane otrzymano w wartościach bezwzględnych, z 64 powtórzeniami na inkrement t_1 . Eksperyment zoptymalizowano na stałą sprzężenia $^1J(\text{C,H}) = 8$ Hz, zastosowano również filtr dolnoprzepustowy dla $^1J(\text{C,H}) = 140$ Hz. Przed transformacją Fouriera dane zostały liniowo uzupełnione do 2048 punktów, zastosowano też procedurę uzupełniania zerami do 4096 punktów w wymiarze F_1 .

PFGSE

Eksperymenty PFGSE otrzymano w następujący sposób: rejestrowano 16 widm z wykorzystaniem sekwencji BPPSTE^{206,207} i DPFGDSTE (z kompensacją konwekcji). Siła gradientu wzrastała w funkcji kwadratowej od 1 do 50 G/cm. Czas dyfuzji (Δ) i czas trwania gradientów (δ) wynosiły odpowiednio 150 ms i 1 ms. Pozostałe parametry wynosiły: okno spektralne (ang. *sweep width*) = 12 kHz dla H_2O , 32K punkty pomiarowe, 128 do 4096 powtórzeń w zależności od stężenia próbki, $d_1 = 2$ s. Do obróbki danych zastosowano procedury Varian DOSY²⁰⁸ i DECRA^{209,210} z pakietu DOSYToolbox v._0.54_15Mar08 M. Nilssona.

Do opracowania widm NMR wykorzystano programy:

1. MestRe-C 2.3a
2. MestReNova 6.0.4-5850
3. Sparky 3.111²¹¹
4. oprogramowanie Vnmrj Varian, pakiet DOSY i DECRA

10.3. Przygotowanie próbek

10.3.1. Topotekan

Chlorowodorek topotekanu zamówiono w firmie Alexis Biochemicals i stosowano bez oczyszczania (czystość ≥ 98 %).

Otrzymywanie wolnego TPT

W celu uzyskania wolnego TPT, chlorowodorek TPT (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) rozpuszczono w 0.5 ml H_2O i za pomocą $NaHCO_{3aq}$ ustalono $pH=7$. Wolny TPT wyekstrahowano chlorkiem metylenu i wysuszono na pompie próżniowej.

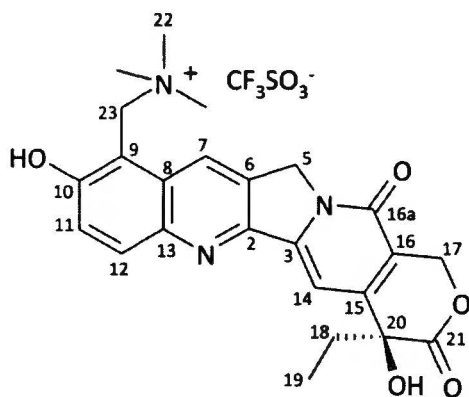
Czwartorzędową pochodną TPT otrzymano według następujących procedur:

1. Ester metylowy kwasu trifluorometanosulfonowego $CF_3SO_3CH_3$ (0.1 ml, 0.9 mmol, Fluka, $\geq 98\%$) rozpuszczono w chlorku metylenu (3 ml) i dodano niewielką ilość K_2CO_3 . Całość mieszano przez 30 minut, w celu zobojętnienia ewentualnego kwasu trifluorometanosulfonowego (CF_3SO_3H). Następnie roztwór odsączono od K_2CO_3 , dodano wolny topotekan (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) i mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Całość wysuszono na pompie próżniowej w temperaturze pokojowej, a następnie rozpuszczono w $DMSO-d_6$. W widmie 1H NMR zaobserwowano 5 produktów: N-metylowany (1) TPT, N,O-dimetylowany TPT (3), protonowany TPT (2), alkohol (4) i jeden niezidentyfikowany. Pożądaný produkt N-metylowania (1) stanowił *ca* 50 % mieszaniny.

1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 0.86$ (t, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3 -19), 1.84 (m, 2H, $J = 7$ Hz, CH_2 -18), 3.10 (s, 9H, $^+NMe_3$ -22), 4.94 (s, 2H, CH_2 -23), 5.30 (s, 2H, CH_2 -5), 5.39 (s, 2H, CH_2 -17), 7.28 (s, 1H, CH-14), 7.63 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-11), 8.23 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-12), 8.96 (s, 1H, CH-7);

^{13}C NMR (DMSO- d_6): $\delta = 8.3$ (CH_3 -19), 30.7 (CH_2 -18), 50.7 (CH_2 -5), 53.2 (NMe_3 -22), 58.9 (CH_2 -23), 65.7 (CH_2 -17), 72.9 (C-20), 96.3 (CH-14), 107.3 (C-9), 118.6 (C-16), 122.9 (CH-11), 126.9 (CH-7), 130.7 (C-8), 131.4 (C-6), 134.5 (CH-12), 144.1 (C-13), 145.9 (C-3), 149.9 (C-2), 150.6 (C-15), 157.3 (C(O)-16a), 158.6 (C-10), 173.0 (C(O)-21);

LR-MS (ESI): m/z (jony dodatnie): 422 $[M+H]^+$ (2), 436 $[M']^+$ (1), 450 $[M'']^+$ (3);
 m/z (jony ujemne): 149 $[CF_3SO_3]^-$.



2. Ester metylowy kwasu metanosulfonowego $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (0.1 ml, 1.2 mmol, Sigma, 99%) rozpuszczono w chlorku metylenu (3 ml) i dodano niewielką ilość K_2CO_3 . Całość mieszano przez 30 minut, w celu zobojętnienia ewentualnego kwasu metanosulfonowego ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$). Następnie roztwór odsączono od K_2CO_3 , dodano wolny topotekan (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) i mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Całość wysuszono na pompie próżniowej (w temperaturze 50°C).
3. Jodek metylu (0.05 ml, 0.8 mmol) rozpuszczono w chlorku metylenu (3 ml) i dodano niewielką ilość K_2CO_3 . Całość mieszano przez 30 minut, w celu zobojętnienia ewentualnego kwasu jodowodorowego. Następnie roztwór odsączono od K_2CO_3 , dodano wolny topotekan (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) i mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Całość wysuszono na pompie próżniowej. Widmo ^1H NMR wykazało obecność skomplikowanej mieszaniny, której nie rozdzielano, ani nie analizowano.
4. Jodek etylu (0.6 ml, 7.5 mmol) rozpuszczono w chlorku metylenu (3 ml) i dodano niewielką ilość K_2CO_3 . Całość mieszano przez 30 minut, w celu zobojętnienia ewentualnego kwasu jodowodorowego. Następnie roztwór odsączono od K_2CO_3 , dodano wolny topotekan (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) i mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Całość wysuszono na pompie próżniowej. Widmo ^1H NMR wykazało obecność skomplikowanej mieszaniny, której nie rozdzielano, ani nie analizowano.

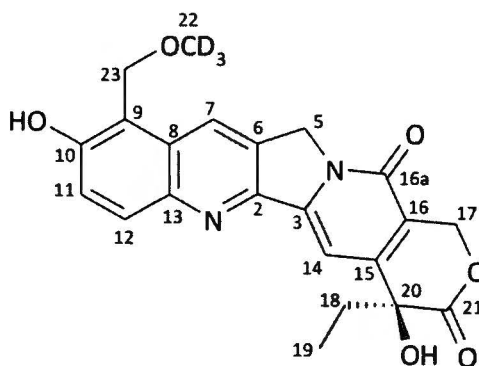
Eterowa pochodna TPT

Chlorowodorek topotekanu (0.5 mg, 1.1×10^{-3} mmol) rozpuszczono w CD_3OD (0.7 ml) i pozostawiono w ciemności na 10 dni. Produkt reakcji został zidentyfikowany jako eter $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{D}_3\text{N}_2\text{O}_6$.

^1H NMR (CD_3OD): $\delta = 1.01$ (t, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3 -19), 1.96 (m, 2H, CH_2 -18), 2.68 (s, 6H, wolna HNMe_2), 4.98 (s, 2H, CH_2 -23), 5.23 (s, 1H, $\frac{1}{2}$ układu AB, druga część zdeuterowana, CH_2 -5), 5.37 (d, 1H, $J = 16$ Hz, CH_2 -17), 5.58 (d, 1H, $J = 16$ Hz, CH_2 -17), 7.47 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-11), 7.64 (s, 1H, CH-14), 8.03 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-12), 8.74 (s, 1H, CH-7);

^{13}C NMR (CD_3OD): $\delta = 8.5$ (CH_3 -19), 31.6 (CH_2 -18), 51.7 (CH_2 -5), 56.8 (OCD_3 -22), 65.2 (CH_2 -23), 67.2 (CH_2 -17), 73.9 (C-20), 98.6 (CH-14), 115.3, (C-9), 119.2 (C-16), 123.9, (CH-7), 132.3 (CH-12), 130.7 (C-8), 144.8 (C-13), 147.2 (C-2), 149.9 (C-3), 152.4 (C-15), 156.5 (C-10), 174.6 (C(O)-21), CH-11 oraz C(O)-16a nie przypisano;

HR-MS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{D}_3\text{N}_2\text{O}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 412.1582, zmierzona: 412.1664.



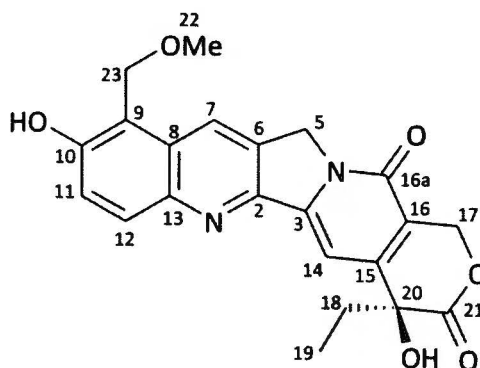
Oczyszczanie TPT x HCl na żelu krzemionkowym

Chlorowodorek topotekanu (2 mg, 4.4×10^{-3} mmol) rozpuszczono w metanolu (1 ml), naniesiono na preparatywną płytkę TLC (żel krzemionkowy 60 F_{254} , 2mm) i rozwinięto w układzie octan etylu/metanol (9 : 1 v/v). Zebrano dwie frakcje, które wymyło z żelu metanolem. Frakcja o $R_f = 0.7$ została zidentyfikowana jako zanieczyszczenia, a frakcja o $R_f = 0.1$ jako eter $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$.

^1H NMR (CD_3OD): $\delta = 1.01$ (t, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3 -19), 1.96 (m, 2H, $J = 7$ Hz, CH_2 -18), 3.44 (s, 3H, OCH_3 -22), 4.98 (s, 2H, CH_2 -23), 5.22 (sygnał resztkowy ze względu na deuterowanie, CH_2 -5), 5.37 (d, 1H, $J = 16$ Hz, CH_2 -17), 5.51 (d, 1H, $J = 16$ Hz, CH_2 -17), 7.36 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-11), 7.59 (s, 1H, CH-14), 7.87 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH-12), 8.52 (s, 1H, CH-7);

^{13}C NMR (CD_3OD): $\delta = 8.2$ (CH_3 -19), 32.6 (CH_2 -18), 51.3 (CH_2 -5), 57.8 (OCH_3 -22), 66.3 (CH_2 -23), 66.7 (CH_2 -17), 74.3 (C-20), 98.3 (CH-14), 115.8, (C-9), 118.5 (C-16), 127.0 (CH-7), 128.9, (CH-11), 130.8 (CH-12), 132.3 (C-8), 143.9 (C-13), 147.3 (C-2), 148.4 (C-3), 153.0 (C-15), 159.5 (C(O)-16a), 165.1, (C-10), 175.1 (C(O)-21);

HR-MS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6$, $[\text{M}-\text{H}]^+$: 407.1237, zmierzona: 407.1231.



Przygotowanie próbek na eksperymenty UV i MALDI

Wysuszoną próbkę po alkilowaniu TPT, zawierającą do 50% czwartorzędowej soli TPT, dodano w nadmiarze do wodnego roztworu oligonukleotydu d(GCGATCGC)₂. Próbki na eksperymenty NMR przygotowano w buforze K₃PO₄/NaCl, natomiast próbki przeznaczone na eksperymenty MALDI, bez buforu, w celu uniknięcia zasolenia próbki. Mieszaninę umieszczono w kwarcowej probówce NMR i naświetlano przez 20 h lampą UV ($\lambda = 365$ nm). Wytrącony osad odsączono, a roztwór wysuszono. Próbki na NMR oczyszczono od nadmiaru niezwiązanej pochodnej TPT poprzez sączenie mieszaniny poreakcyjnej przez kolumnę HiTrap, a następnie odsolenie na kolumnie z wypełnieniem Sephadex G10. Próbkę na MALDI przygotowano na matrycy: kwas 3-hydroksypikolinowy/cytrynian diamonowy (8:1). Dodatkowo, do próbek został dodany wymiennicz jonowy w celu lepszego usunięcia kationów sodowych i potasowych.

10.3.2. Genisteina

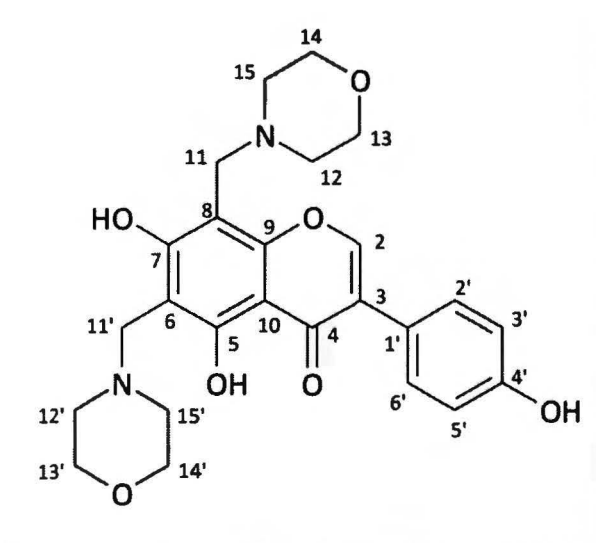
Pochodne genisteiny zostały zsyntetyzowane i scharakteryzowane przez A. Misior²⁰⁰ i R. Kawęckiego.

Pochodną Gen 2 otrzymano według następującej procedury:

Genisteinę (100 mg, 0.370 mmola) i morfolinę (64 mg, 0.740 mmola) rozpuszczono w metanolu i ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury 65 °C. Dodano formaldehyd (138 mg, 1.850 mmola) i w tych warunkach prowadzono reakcję przez 6 h. Następnie zawartość kolby zatężono na wyparce i oczyszczono na silikażelu, stosując jako eluent CH₂Cl₂/CH₃OH w stosunku 15:1.

¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.64$ (b, 8H, C-12, C-12', C-15, C-15'), 3.77 (b, 8H, C-13, C-13', C-14, C-14'), 3.85 (s, 4H, CH₂-11, CH₂-11'), 6.78-6.84 (m, 2H, CH-3', CH-5'), 7.29-7.35 (m, 2H, CH-2', CH-6'), 7.68 (s, 1H, CH-2);

¹³C NMR (CDCl₃): $\delta = 50.5$ (CH₂-11), 52.2 (CH₂-11'), 52.8 (C-12, C-15), 53.1 (C-12', C-15'), 66.3 (C-13, C-14), 66.4 (C-13', C-14'), 99.8 (C-8), 103.7 (C-6), 104.5 (C-10), 115.6 (C-3', C-5'), 121.7 (C-1'), 123.0 (C-3), 129.9



(C-2', C-6'), 152.1 (C-2), 155.4 (C-9), 157.0 (C-4'), 159.7 (C-5), 164.6 (C-7), 180.8 (C-4);

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{25}H_{29}N_2O_7$, $(M+H)^+$: 469.19593, zmierzona: 469.1959.

Pochodną Gen 3 otrzymano według następującej procedury:

Genisteinę (58 mg, 0.21 mmol) i kwas octowy (0.5 ml) rozpuszczono w metanolu (22 ml). Do tej mieszaniny dodano roztwór dimetyloaminy w metanolu (40%, 0.2 ml, 1.40 mmol) i formaldehyd (37%, 151 mg, 1.87 mmol). Reakcję prowadzono przez 2 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki na wyparce. Pozostałość rozpuszczono w metanolu (5 ml) i odparowano (operację wykonano dwukrotnie). Mieszaniny nie udało się rozdzielić metodami chromatograficznymi, więc była stosowana bez oczyszczania.

1H NMR ($H_2O + 15\% CD_3OH$): $\delta = 2.82$

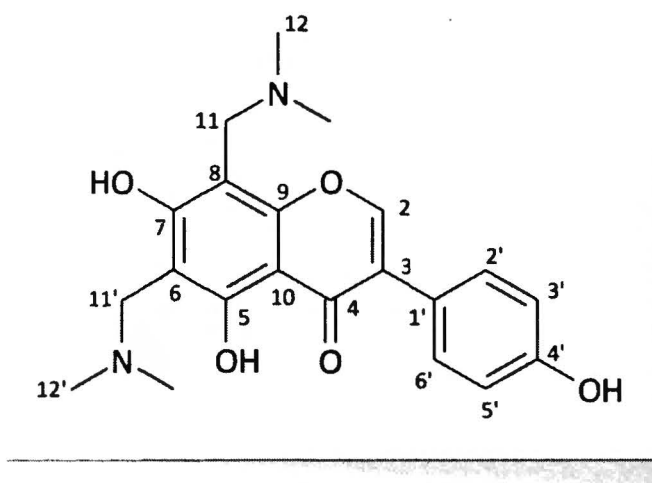
(s, 12H, NMe_2 -12, NMe_2 -12'), 4.15 (s, 2H, CH_2 -11'), 4.17 (s, 2H, CH_2 -11), 6.83 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.21 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.78 (s, 1H, H-2);

^{13}C NMR ($H_2O + 15\% CD_3OH$): $\delta = 42.9$

(NMe_2 -12 lub NMe_2 -12'), 43.0 (NMe_2 -12 lub NMe_2 -12'), 52.2 (CH_2 -11', CH_2 -11), 97.8 (C-8), 103.7 (C-6), 116.1 (CH -3', CH -5'), 122.9 (C-3), 123.4 (C-1'),

131.3 (CH -2', CH -6'), 153.3 (CH -2), 157.0 (C-4'), 159.0 (C-9), 162.9 (C-5), 180.3 (C(O)-4), C-7 oraz C-10 nie przypisano;

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{21}H_{25}N_2O_5$, $(M+H)^+$: 385.17736, zmierzona: 385.1774.



10.3.3. Oligomery DNA

Wszystkie oligomery DNA zamówiono w firmie IDT (USA), zabezpieczone i odsolone. Nukleotydy oczyszczano techniką chromatografii jonowymiennej na kolumnie HiTrapTM-Q (Pharmacia Biotech) z wykorzystaniem gradientowej elucji roztworami wodorowęglanu amonu (stężenia od 0.1 do 1 M), a następnie odsolono na kolumnie z wypełnieniem Sephadex G-10. Oligonukleotyd rozpuszczono w buforze H_2O zawierającym 25 mM K_3PO_4 i różną ilość NaCl (od 25 do 200 mM). Ustalono pH = 6 przy użyciu roztworów HCl/DCl lub NaOD. Stężenie dodekameru wyznaczano

mierząc absorpcję UV. Paramagnetyczne zanieczyszczenia usuwano stosując wypełnienie kolumn Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories).

Stosowane nukleotydy:

- oktamer: 5'-GCGATCGC-3';
- dekamer typu hantli z przerwą (NICK I): 5'-TCGAACGC/iSp18/GCTG/3Phos/-3' nukleotydu z linkerem PEG₆ (iSp18);
- dodekamer typu hantli z dwiema przerwami (NICK II): 5'-TCG AAC GC/iSp18/G CGT /3Phos/-3'.

10.4. Obliczenie struktury hantli i kompleksu DNA – Gen 3

Obliczenie struktury hantli DNA oraz kompleksu hantla DNA – Gen 3 przebiegało w analogiczny sposób. Wykorzystując program SPARKY do przypisań sygnałów korelacyjnych i integracji ich objętości, z widma NOESY uzyskano 374 i 390 objętości sygnałów korelacyjnych NOE (odpowiednio dla samej hantli oraz kompleksu DNA – Gen 3). Objętości NOE zamieniono na więzy górne i dolne, wykorzystując MARDIGRAS (ver. 5.21). Algorytm MARDIGRAS zamienia macierz intensywności (intensywności nieobserwowane są dostarczane z modelu) na macierz współczynników relaksacji, która jest poprawiona procedurą iteracji. Następnie z końcowych korelacyjnych współczynników relaksacji obliczane są odległości. Uzyskano w ten sposób 431 oraz 610 więzów (odpowiednio dla samej hantli oraz dla kompleksu DNA – Gen 3), uwzględniając symetrię C2 cząsteczki. W przypadku obliczania struktury kompleksu DNA – Gen 3, względnie również 13 dodatkowych więzów z międzycząsteczkowych sygnałów korelacyjnych NOE w kompleksie. Uściślenie struktury z zastosowaniem metod dynamiki molekularnej (program AMBER²¹²) wymagało dodatkowych 52 więzów Watsona – Cricka. Zastosowano ogólny model solwatacji Born'a (GB)^{213,214} wykorzystujący metodę symulowanego wyżarzania (ang. *simulated annealing*).

10.5. Uściślenie struktury

Minimalizację 500 energii przeprowadzono dla 10 początkowych cząsteczek hantli zbudowanych z wykorzystaniem kanonicznych struktur A i B DNA oraz form przejściowych (w przypadku kompleksu DNA – Gen 3, były to formy przejściowe z cząsteczką Gen 3 umieszczoną w pobliżu przerwy). Następnie przeprowadzono dwa cykle 15 ps symulowanego wyżarzania z GB: 0 – 1000 kroków ogrzewania układu od 10 do 1100 K, 1001 – 3000 kroków w temperaturze 1100 K, 3000

– 15000 kroków chłodzenia do 0 K, 0 – 3000 kroków wolnego ogrzewania i ustalania równowagi (TAUTP = 0.2), 3001 – 11000 kroków powolnego chłodzenia (TAUTP = 4.0 – 2.0), 11000 – 13000 kroków szybszego chłodzenia (TAUTP = 1.0) i 13000 – 15000 kroków szybkiego chłodzenia, jak minimalizacja (TAUTP = 0.5 – 0.05), w krokach 0 – 3000 więzy powoli zwiększano, od 10% do 100% wartości końcowych. Wartość odcięcia ustawiono na 15 Å. W przypadku obliczeń struktury kompleksu DNA – Gen 3, z 10 otrzymanych struktur wybrano 2, które były najlepiej dopasowane do 13 więzów pochodzących z międzycząsteczkowych oddziaływań korelacyjnych pomiędzy hantłą a Gen 3. W obu strukturach genisteina interkaluje od strony przerwy. Obie struktury oraz 8 dodatkowych opartych na dwóch, w których zmodyfikowano orientację Gen 3 w przerwie, zostały wybrane do dalszych obliczeń. Dla tych struktur powtórzono dwie pełne procedury MARDIGRAS oraz symulowanego wyżarzania. Wybrano struktury, które miały najlepsze dopasowanie do 13 więzów eksperymentalnych.

ZAŁĄCZNIK 1: Wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych

Publikacje:

1. K. Hyz, R. Kawęcki, E. Bednarek, W. Bocian, J. Sitkowski, L. Kozerski, *Magn. Res. Chem.*, **2010**, 48, 575 – 584. Topotecan dynamics, tautomerism and reactivity – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR and ESI MS study;
2. K. Hyz, W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, L. Kozerski. A dumbbell double nicked duplex dodecamer DNA with PEG₆ tether, praca zgłoszona;
3. K. Hyz, R. Kawęcki, K. Siedlecka, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, L. Kozerski. Genistein binding mode with thymidyn base in dumbbell DNA. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and diffusion ordered NMR study, praca w przygotowaniu;
4. K. Hyz, R. Kawęcki, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, M. Sochacki, L. Kozerski. Trimethylammonium triflate salt of topotecan binds covalently DNA duplex on near UV irradiation, praca w przygotowaniu.

Wystąpienia konferencyjne:

1. XL Ogólnopolskie seminarium na temat magnetycznego rezonansu jądrowego i jego zastosowań, 3-4. grudnia 2007, Kraków (sesja plakatowa: Badanie tautomerii topotekanu w różnych rozpuszczalnikach metodą NMR);
2. 23th Central European NMR Meeting, 20-23. kwietnia 2008, Valtice, Czechy (komunikat: Tautomerism and reactivity of topotecan under various conditions);
3. EUROMAR Conference, 5-9. lipca 2009, Göteborg, Szwecja (sesja plakatowa: NMR investigation of the anticancer drug - topotecan);
4. Joint EUROMAR and 17th ISMAR Conference, 4-9. lipca 2010, Florencja, Włochy (sesja plakatowa: A dumbbell double nicked duplex dodecamer DNA with PEG₆ tether);
5. VIth Symposium: Nuclear magnetic resonance In chemistry, physics and biological sciences, 22-24. września 2010, Warszawa (sesja plakatowa: A dumbbell double nicked duplex dodecamer DNA with PEG₆ tether; Young Scientist Contest Award).

Jestem również realizatorką grantu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N204 155736.

Literatura

- ¹ J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 933 – 952. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids;
- ² R. E. Dickerson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 1797 – 1803. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components;
- ³ www.who.int;
- ⁴ B. C. Baguley, D. J. Kerr, *Anticancer drug development*, **2002**, Academic Press;
- ⁵ R. B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, **2004**, Elsevier Academic Press;
- ⁶ H. K. Wang, S. L. Morris-Natschke, K. H. Lee, *Med. Res. Rev.* **1997**, *17*, 367 – 425. Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents;
- ⁷ F. Zunino, G. Pratesi, *C. Expert Opin. Investig. Drugs*, **2004**, *13*, 269 – 284. Camptothecins in clinical development;
- ⁸ C. J. Thomas, N. J. Rahier, S. M. Hecht, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 1585 – 1604. Camptothecin: current perspectives;
- ⁹ W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, M. P. Williamson, P. E. Hansen, L. Kozerski, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 2788 – 2794. Binding of topotecan to a nicked DNA oligomer in solution;
- ¹⁰ H. P. Lee, L. Gourley, S. W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, N. E. Day, *Lancet*, **1991**, *337*, 1197 – 1200. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore;
- ¹¹ R. B. Sinden, *DNA structure and function*, **1994**, Academic Press;
- ¹² J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, **1995**, Oxford University Press;
- ¹³ US National Library of Medicine, <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/dnastructure.jpg>;
- ¹⁴ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, **2005**, PWN, Warszawa;
- ¹⁵ G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic acids in chemistry and biology*, **2006**, The Royal Society of Chemistry;
- ¹⁶ B. Hartmann, R. Lavery, *Quart. Rev. Biophys.*, **1996**, *29*, 309 – 368. DNA structural forms;
- ¹⁷ S. Singh, P. K. Patel, R. V. Hosur, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 13214 – 13222. Structural polymorphism and dynamism in the DNA segment GATCTCCCCCGGAA: NMR investigations of hairpin, dumbbell, nicked duplex, parallel strands and *i*-motif;
- ¹⁸ A. Jain, G. Wang, K. M. Vasquez, *Biochimie*, **2008**, 1117 – 1130. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential;
- ¹⁹ J. Müller, *Metalomics*, **2010**, *2*, 318 – 327. Functional metal ions in nucleic acids;
- ²⁰ B. Chen, J. Liang, X. Tian, X. Liu, *Biochemistry (Moscow)*, **2008**, *73*, 1061 – 1070. G-quadruplex structure: a target for anticancer therapy and a probe for detection of potassium;
- ²¹ L. A. Marky, K. S. Blumenfeld, S. Kozlowski, K. J. Breslauer, *Biopolymers*, **1983**, *4*, 1247 – 1257. Salt-dependent conformational transitions in the self-complementary deoxydodecanucleotide d(CGCAATTCGCG): evidence for hairpin formation;
- ²² D. E. Wemmer, S. H. Chou, D. R. Hare, B. R. Reid, *Nucleic Acids Res.*, **1985**, *13*, 3755 – 3722. Duplex-hairpin transitions in DNA: NMR studies on CGCGTATACGCG;
- ²³ D. R. Hare, B. R. Reid, *Biochemistry*, **1986**, *25*, 5341 – 5350. Three-dimensional structure of a DNA hairpin in solution: two-dimensional NMR studies and distance geometry calculations on d(CGCGTTTCGCG);
- ²⁴ R. Chattopadhyaya, S. Ikuta, K. Grześkowiak, R. E. Dickerson, *Nature*, **1988**, *334*, 175 – 179. X-ray structure of a DNA hairpin molecule;
- ²⁵ L. E. Xodo, G. Manzini, F. Quadrifoglio, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6321 – 6326. Oligodeoxynucleotide folding in solution: loop size and stability of B-hairpins;

- ²⁶ L. E. Xodo, G. Manzini, F. Quadrioglio, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6327 – 6331. The B-Z conformational transition in folded oligodeoxynucleotides: loop size and stability of Z-hairpins;
- ²⁷ J. R. Williamson, S. G. Boxer, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 2819 – 2831. Multinuclear NMR studies of DNA hairpins. 1. Structure and dynamics of d(CGCGTTGTTTCGCG);
- ²⁸ M. J. J. Blommers, J. A. L. I. Walters, C. A. G. Hasnoot, J. M. A. Aelena, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. W. Hilbers, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 7491 – 7498. Effects of base sequence on the loop folding in DNA hairpins;
- ²⁹ S. M. Baxter, M. B. Greizerstein, D. M. Kushlan, G. W. Ashley, *Biochemistry*, **1993**, *33*, 8702 – 8711. Conformational properties of DNA hairpins with TTT and TTTT loops;
- ³⁰ L. J. Rinkiel, I. Tinoco Jr, *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 13, 3695 – 3700. A proton NMR study of a DNA dumbbell structure with hairpin loops of only two nucleotides: d(CACGTGTGTGCGTGCA);
- ³¹ M. J. Doktycz, R. F. Goldstein, T. M. Paner, F. J. Gallo, A. S. Benight, *Biopolymers*, **1992**, *32*, 849 – 864. Studies of DNA dumbbells. I. Melting curves of 17 DNA dumbbells with different duplex stem sequence linked by T₄ endloops: evaluation of the nearest-neighbour stacking interactions in DNA;
- ³² D. Rentzeperis, J. Ho, L. A. Marky, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 10, 2564 – 2572. Contributions of loops and nicks to the formation of DNA dumbbells: melting behavior and ligand binding;
- ³³ M. Amaratunga, E. Snowden-lfft, D. E. Wemmer, A. S. Benight, *Biopolymers*, **2004**, *32*, 7, 865 – 879. Studies of DNA dumbbells. II. Construction and characterization of DNA dumbbells with a 16 base-pair duplex stem and T_n end loops (n = 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14);
- ³⁴ M. Durand, K. Chevie, M. Chassignol, N. T. Thuong, J. C. Maurizot, *Nucl. Acids Res.*, **1990**, *18*, 6353 – 6359. Circular dichroism studies of an oligodeoxyribonucleotide containing a hairpin loop made of a hexaethylene glycol chain: conformation and stability;
- ³⁵ M. McCullagh, L. Zhang, A. H. Karaba, H. Zhue, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 11415 – 11421. Effect of loop distortion on the stability and structural dynamics of DNA hairpin and dumbbell conjugates;
- ³⁶ H. Gao, N. Chidambaram, B. C. Chen, D. E. Pelham, R. Patel, M. Yang, L. Zhou, A. Cook, J. S. Cohen, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 445 – 453. Double-stranded cyclic oligonucleotides with non-nucleotide bridges;
- ³⁷ A. Kornberg, *DNA replication*, Second edition, **2005**, University Science Book;
- ³⁸ M. Lukin, C. de los Santos, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 607 – 686. NMR structures of damaged DNA;
- ³⁹ J. M. L. Pieters, R. M. W. Manst, H. van den Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. Altona, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 4551 – 4556. Conformational and thermodynamic consequences of the introduction of a nick in duplexed DNA fragments: an NMR study augmented by biochemical experiments;
- ⁴⁰ E. Snowden-lfft, D. E. Wemmer, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 6017 – 6025. Characterization of the structure and melting of DNAs containing backbone nick and gaps;
- ⁴¹ J. B. Mills, J. P. Cooper, P. J. Hagerman, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 1797 – 1803. Electrophoretic evidence that single-stranded regions of 1 or more nucleotides dramatically increase the flexibility of DNA;
- ⁴² C. Roll, C. Katterle, V. Faibis, G. V. Fazakerley, Y. Boulard, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 4059 – 4070. Conformations of nicked and gapped DNA structures by NMR and molecular dynamic simulations in water
- ⁴³ C. Roll, C. Katterle, Y. Boulard, G. V. Fazakerley, *Biochimie*, **1997**, *79*, 593 – 597. Structure of oligonucleotides with either a strand break or a bulged nucleotide;
- ⁴⁴ L. Kozerski, A. P. Mazurek, R. Kawęcki, W. Bocian, P. Krajewski, E. Bednarek, J. Sitkowski, M. P. Williamson, A. J. Moir, P. E. Hansen, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 1132 – 43. A nicked duplex decamer DNA with a PEG(6) tether;

- ⁴⁵ F. J. Van de Ven, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *178*, 1 – 38. Nucleic acids and nuclear magnetic resonance;
- ⁴⁶ J. C. Wang, *J. Mol. Biol.*, **1971**, *55*, 523 – 533. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega;
- ⁴⁷ M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O’Dea, H. A. Nash, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1976**, *73*, 3872 – 3876. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA;
- ⁴⁸ <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter29/F29-30.jpg>;
<http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter29/F29-25a.jpg>;
<http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter29/F29-25b.jpg>;
- ⁴⁹ R. Kavenoff, L. C. Klotz, B. H. Zimm, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **1974**, *38*, 1 – 8. On the nature of chromosome-sized DNA molecules;
- ⁵⁰ R. Weil, J. Vinograd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1963**, *50*, 730 – 739. The cyclic coil helix and cyclic forms of polyoma viral DNA;
- ⁵¹ J. C. Wang, *Q. Rev. Biophys.*, **1998**, *31*, 107 – 144. Moving on DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine;
- ⁵² P. Forterre, S. Gribaldo, D. Gadelle, M.-C. Serre, *Biochimie*, **2007**, *89*, 427 – 446. Origin and evolution of DNA topoisomerases;
- ⁵³ B. L. Staker, K. Hjerrild, M. D. Feese, C. A. Behnke, A. B. Burgin, Jr., L. Stewart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 24, 15387 – 15392. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog;
- ⁵⁴ J. M. Berger, S. J. Gamblin, S. C. Harrison, J. C. Wang, *Nature*, **1996**, *379*, 225 – 232. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II;
- ⁵⁵ X.-L. Yang, A. H.-J. Wang, *Pharmacol. Therap.*, **1999**, *83*, 181 – 215. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA;
- ⁵⁶ X. Cai, P. J. Gray Jr., D. D. Von Hoff, *Canc. Treat. Rev.*, **2009**, *35*, 437 – 450. DNA minor groove binders: back in the groove;
- ⁵⁷ S. M. Nelson, L. R. Ferguson, W. A. Denny, *Mut. Res.*, **2007**, *623*, 24 – 40. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents;
- ⁵⁸ S. Neidle, *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 291 – 309. DNA minor-groove recognition by small molecules;
- ⁵⁹ R. Martinez, L. Chacon-Garcia, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 127 – 151. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not worked;
- ⁶⁰ O. D. Schärer, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 27 – 32. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses;
- ⁶¹ V. A. Efimov, S. V. Fedyunin, O. G. Chakhmakhcheva, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2010**, *36*, 49 – 72. Cross-linked nucleic acids: formation, structure and biological function;
- ⁶² Y. Song, P. Wang, J. Wu, X. Zhou, X.-L. Zhang, L. Weng, X. Cao, F. Liang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 1660 – 1664. Biological studies of photoinducible phenol quaternary ammonium derivatives;
- ⁶³ X. Weng, L. Ren, L. Weng, J. Huang, S. Zhou, X. Zhou, L. Weng, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 8020 – 8023. Synthesis and biological studies of inducible DNA cross-linking agents;
- ⁶⁴ Z. Song, X. Weng, L. Weng, J. Huang, X. Wang, M. Bai, Y. Zhou, G. Yang, X. Zhou, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5751 – 5754. Synthesis and oxidation-induced DNA cross-linking capabilities of bis(catechol) quaternary ammonium derivatives;
- ⁶⁵ H. Wang, M. S. Wahi, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1291 – 1293. Immobilizing a transient electrophile for DNA cross-linking;
- ⁶⁶ J. E. Deweese, N. Osheroff, *Nucl. Acids. Res.*, **2009**, *37*, 738 – 748. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep’s clothing;

- ⁶⁷ X. Wang, L.-K. Wang, W. D. Kingsbury, R. K. Johnson, S. M. Hecht, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 9399 – 9408. Differential effects of camptothecin derivatives on topoisomerase I-mediated DNA structure modification;
- ⁶⁸ M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 3888 – 3890. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca Acuminata*;
- ⁶⁹ C. Bailly, A. Lansiaux, L. Dassonneville, D. Demarquay, H. Coulomb, M. Huchet, O. Lavergne, D. C. C. Bigg, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 15556 – 15563. Homocamptothecin, an E-ring-modified camptothecin analogue, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks;
- ⁷⁰ Y.-H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 14873 – 14878. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I;
- ⁷¹ E. Fattorusso, O. Taglialatela-Scafati, *Modern Alkaloid. Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, **2008**, Wiley-VCH;
- ⁷² D. Yang, J. T. Strode, H. P. Spielmann, A. H.-J. Wang, T. G. Burke, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2979 – 2980. DNA interactions of two clinical camptothecin drugs stabilize their active lactone forms;
- ⁷³ I. Chourpa, J.-F. Riou, J.-M. Millot, Y. Pommier, M. Manfait, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 7284 – 7291. Modulation in kinetics of lactone ring hydrolysis of camptothecins upon interaction with topoisomerase I cleavage sites on DNA;
- ⁷⁴ C. H. Takimoto, J. Wright, S. G. Arbuck, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1400*, 107 – 119. Clinical applications of the camptothecins;
- ⁷⁵ M. J. Luzzio, J. M. Besterman, D. L. Emerson, M. G. Evans, K. Lackey, P. L. Leitner, G. McIntyre, B. Morton, P. L. Myers, M. Peel, J. M. Sisco, D. D. Sternbach, W.-Q. Tong, A. Truesdale, D. E. Uehling, A. Vuong, J. Yates, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 395 – 401. Synthesis and antitumor activity of novel water soluble derivatives of camptothecin as specific inhibitors of topoisomerase I;
- ⁷⁶ I. Mitsui, E. Kumazawa, Y. Hirota, M. Aonuma, M. Sugimori, S. Ohsuki, K. Uoto, A. Ejima, H. Terasawa, K. A. Sato, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1995**, *86*, 776 – 782. A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors *in vitro* and *in vivo*;
- ⁷⁷ Y. Pommier, *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 789 – 802. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond;
- ⁷⁸ H.-K. Wang, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, *Med. Res. Rev.*, **1997**, *17*, *4*, 367 – 425. Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents.;
- ⁷⁹ R. C. Gallo, J. Whang-Peng, R. H. Adamson, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1971**, *46*, 789 – 795. Studies on the antitumor activity, mechanism of action and cell cycle effects of camptothecin;
- ⁸⁰ J. Nitiss, J. C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, 7501 – 7505. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast;
- ⁸¹ Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Urasaki, J. Wu, G. S. Laco, *Drug Resistance Updates*, **1999**, *2*, 307 – 318. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance;
- ⁸² G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman, *Anticancer agents from natural products*, **2005**, Taylor & Francis Group;
- ⁸³ W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, A. Pietrzyk, M. P. Williamson, P. E. Hansen, L. Kozerski, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 5776 – 5787. Multiple binding modes of camptothecin family to DNA oligomers;
- ⁸⁴ R. P. Hertzberg, R. W. Busby, M. J. Caranfa, K. G. Holden, R. K. Johnson, S. M. Hecht, W. D. Kingsbury, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 19287 – 19295. Irreversible trapping of the DNA – topoisomerase I covalent complex;
- ⁸⁵ Y. Pommier, G. Kohlhagen, K. W. Kohn, F. Leteurtre, M. C. Wani, M. E. Wall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 8861 – 8865. Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I – DNA cleavage sites;

- ⁸⁶ Y. Fan, J. N. Weinstein, K. W. Kohn, L. M. Shi, Y. Pommier, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2216 – 2226. Molecular modelling studies of the DNA – topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin;
- ⁸⁷ J. E. Kerrigan, D. S. Pilch, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 9792 – 9798. A structural model of the ternary cleavable complex formed between human topoisomerase I, DNA and camptothecin;
- ⁸⁸ G. S. Laco, J. R. Collins, B. T. Luke, H. Kroth, J. M. Sayer, D. M. Jerina, Y. Pommier, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1428 – 1435. Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model;
- ⁸⁹ U. Yoshimasa, G. S. Laco, P. Pourquier, Y. Takebayashi, G. Kohlhagen, C. Gioffre, H. Zhang, D. Chatterjee, P. Pantazis, Y. Pommier, *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 1964 – 1969. Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line;
- ⁹⁰ A. Fujimori, W. G. Harker, G. Kohlhagen, Y. Hoki, Y. Pommier, *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 1339 – 1346. Mutation at the catalytic site of topoisomerase I in CEM/C2, a human leukemia cell line resistant to camptothecin;
- ⁹¹ A. D. Jensen, J. Q. Svestrup, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *236*, 389 – 394. Purification and characterization of human topoisomerase I mutants;
- ⁹² S. Mazzini, M. C. Bellucci, S. Dallavalle, F. Fraternali, R. Mondelli, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 505 – 513. Mode of binding of camptothecins to double helix oligonucleotides.
- ⁹³ S. A. Streltsov, A. L. Mikheikin, S. L. Grokvovsky, V. A. Oleinikov, A. L. Zhuze, *Mol. Biol.*, **2002**, *36*, 400 – 411. Interaction of topotecan, DNA topoisomerase I inhibitor, with double-stranded polydeoxyribonucleotides. 3. Binding at the minor groove;
- ⁹⁴ S. A. Streltsov, A. L. Mikheikin, S. L. Grokvovsky, V. A. Oleinikov, A. L. Zhuze, *Mol. Biol.*, **2002**, *36*, 736 – 753. Interaction of topotecan, DNA topoisomerase I inhibitor, with double-stranded polydeoxyribonucleotides. 4. Topotecan binds preferably to the GC base pairs of DNA;
- ⁹⁵ M. L. Rothenberg, *Annals of Oncology*, **1997**, *8*, 837 – 855. Topoisomerase I inhibitors: review and update;
- ⁹⁶ K. Lackey, J. M. Besterman, W. Fletcher, P. Leitner, B. Morton, D. D. Sternbach, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 906 – 911. Rigid analogues of camptothecin as DNA topoisomerase I inhibitors;
- ⁹⁷ M. Ihara, K. Noguchi, T. Ohsawa, K. Fukumoto, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 3150 – 3156. Studies on the synthesis of heterocyclic compounds and natural products. 999. Double enamine annelation of 3, 4-dihydro-1-methyl- β -carboline and isoquinoline derivatives with 6-methyl-2-pyrone-3, 5-dicarboxylates and its application for the synthesis of (+/-)-camptothecin;
- ⁹⁸ T. Kurihara, H. Tanno, S. Takemura, S. Harusawa, R. Yoneda, *J. Heterocycl. Chem.*, **1993**, *30*, 643 – 652. Synthesis of C-nor-4,6-secocamptothecin and related compounds;
- ⁹⁹ D. Subrahmanyam, A. Venkateswarlu, K. V. Rao, T. VRS Sastry, G. Vandana, S. A. Kumar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 1633 – 1638. Novel C-ring analogues of 20(S)-camptothecin Part2: synthesis and *in vitro* cytotoxicity of 5-C-substituted 20(S)-camptothecin analogues;
- ¹⁰⁰ M. Sugimori, A. Ejima, S. Ohsuki, K. Matsumoto, Y. Kawato, M. Yasuoka, H. Tagawa, H. Terasawa, *Heterocycles*, **1994**, *38*, 81 – 94. Antitumor agents. VI. Synthesis and antitumor activity of ring A-, B-, C-modified derivatives of camptothecin;
- ¹⁰¹ M. C. Wani, P. E. Ronman, J. T. Lindley, M. E. Wall, *J. Med. Chem.*, **1980**, *23*, 554 – 560. Plant antitumor agents 18. Synthesis and biological activity of camptothecin analogues;
- ¹⁰² M. C. Wani, A. W. Nicholas, M. E. Wall, *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 2358 – 2363. Plant antitumor agents 23. Synthesis and antileukemic activity of camptothecin analogues;
- ¹⁰³ M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar, M. E. Wall, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 1774 – 1779. Plant antitumor agents 25. Total synthesis and antileukemic activity of ring A substituted camptothecin analogues. Structure-activity correlations;
- ¹⁰⁴ W. D. Kingsbury, J. C. Boehm, D. R. Jakas, K. G. Holden, S. M. Hecht, G. Gallagher, M. J. Caranfa, F. L. McCabe, L. F. Faucette, R. K. Johnson, R. P. Hertzberg, *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 98 –

107. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity;

¹⁰⁵ M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar, C. Tele, L. Moore, A. Truesdale, P. Leitner, J. M. Besterman, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 2689 – 2700. Plant antitumor agents 30. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogues;

¹⁰⁶ X. Wang, X. Zhou, S. M. Hecht, *Biochemistry*, **1999**, 38, 4374 – 4381. Role of the 20-hydroxyl group in camptothecin binding by the topoisomerase I – DNA binary complex;

¹⁰⁷ R. P. Hertzberg, M. J. Caranfa, K. G. Holden, D. R. Jakas, G. Gallagher, M. R. Mattern, S. M. Mong, J. O. Bartus, R. K. Johnson, W. D. Kingsbury, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 715 – 720. Modification of the hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity;

¹⁰⁸ M. E. Wall, *Med. Res. Rev.*, **1998**, 18, 5, 299 – 314. Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic;

¹⁰⁹ L. Lesueur-Ginot, D. Demarquay, R. Kiss, P. G. Kasprzyk, L. Dassonneville, C. Bailly, J. Camara, O. Lavergne, D. C. H. Bigg, *Cancer Res.*, **1999**, 59, 2939 – 2943. Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties;

¹¹⁰ D. Demarquay, M. Huchet, H. Coulomb, L. Lesueur-Ginot, O. Lavergne, J. Camara, P. G. Kasprzyk, G. Prevost, D. C. H. Bigg, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 4942 – 4949. BN80927: a novel homocamptothecin that inhibits proliferation of human tumor cells *in vitro* and *in vivo*;

¹¹¹ O. Lavergne, L. Lesueur-Ginot, F. Pla Rodas D. C. H. Bigg, *Bioorg. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 2235 – 2238. An E-ring modified camptothecin with potent antiproliferative and topoisomerase I inhibitory activities;

¹¹² A. Cagir, S. H. Jones, R. Gao, B. M. Eisenhauer, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13628 – 13629. Luotonin A. A naturally occurring human DNA topoisomerase I poison;

¹¹³ C. A. H. van Hattum, H. M. Pinedo, H. M. M. Schlüper, C. A. M. Erkelens, A. Tohgo, E. Boven, *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, 64, 1267 – 1277. The activity profile of the hexacyclic camptothecin derivative DX-8951ff in experimental human colon cancer and ovarian cancer;

¹¹⁴ K. Lackey, D. D. Sternbach, D. K. Croom, D. L. Emerson, M. G. Evans, P. L. Leitner, M. J. Luzzio, G. McIntyre, A. Vuong, J. Yates, J. M. Besterman, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 713 – 719. Water soluble inhibitors of topoisomerase I: quaternary salt derivatives of camptothecin;

¹¹⁵ N. Rahier, B. M. Eisenhauer, R. Gao, S. H. Jones, S. M. Hecht, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 321 – 324. Water soluble camptothecin derivatives that are intrinsic topoisomerase I poisons;

¹¹⁶ Josien, D. Bom, D. P. Curran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 3189 – 3194. 7-Silylcampothecins (silatecans): a new family of camptothecin antitumor agents;

¹¹⁷ S. Dallavalle, A. Ferrari, B. Biasotti, L. Merlini, S. Penco, G. Gallo, M. Marzi, M. O. Tinti, R. Martinelli, C. Pisano, P. Carminati, N. Carenini, G. Beretta, P. Perego, M. De Cesare, G. Pratesi, F. Zunino, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 3264 – 3274. Novel 7-oxyiminomethyl derivatives of camptothecin with potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity;

¹¹⁸ I. F. Pollack, M. Erff, D. Bom, T. G. Burke, J. T. Strode D. P. Curran, *Cancer Res.*, **1999**, 59, 4989 – 4905. Potent topoisomerase I inhibition by novel silatecans eliminates glioma proliferation *in vitro* and *in vivo*;

¹¹⁹ D. Bom, D. P. Curran, A. J. Chavan, S. Kruszewski, S. G. Zimmer, K. A. Fraley, T. G. Burke, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3018 – 3022. Novel A, B, E-ing-modified camptothecins displaying high lyophilicity and markedly improved human blood stabilities;

¹²⁰ R. Gacia-Carbonero, J. G. Supko, *Clinical Cancer Res.*, **2002**, 8, 641 – 661. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology and continued development of camptothecins;

¹²¹ H. Ulukan, P. W. Swaan, *Drugs*, **2002**, 62, 2039 – 2057. Camptothecins. A review of their chemotherapeutic potential;

- ¹²² M. R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J. J. Champoux, H. G. J. Hol, *Science*, **1998**, 279, 1504 – 1513. Crystal Structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA;
- ¹²³ J. J. Champoux, R. Aronoff, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 1010 – 1015. The effects of camptothecin on the reaction and the specificity of the wheat germ type I topoisomerase;
- ¹²⁴ S. Yao, D. Murali, P. Seetharamulu, K. Haridas, P. N. V. Petluru, D. G. Reddy, F. H. Hausheer, *Cancer Res.*, **1998**, 58, 3782 – 3786. Topotecan lactone selectively binds to double- and single-stranded DNA in the absence of topoisomerase I;
- ¹²⁵ N. Sanna, G. Chillemi, A. Grandi, S. Castelli, A. Desideri, V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 15429 – 15436. New hints on the pH-driven tautomeric equilibria of the topotecan anticancer drug in aqueous solutions from an integrated spectroscopic and quantum-mechanical approach;
- ¹²⁶ Y. Yamashita, N. Fujii, C. Murakata, T. Ashizawa, M. Okabe, H. Nakano, *Biochemistry*, **1992**, 31, 12069 – 12075. Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives;
- ¹²⁷ M. L. Rothenberg, *Annals of Oncology*, **1997**, 8, 837 – 855. Topoisomerase I inhibitors: review and update;
- ¹²⁸ L.-H. Meng, Z.-Y. Liao, Y. Pommier, *Curr. Topics Med. Chem.*, **2003**, 3, 305 – 320. Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer chemotherapy;
- ¹²⁹ W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23, 519 – 534. Flavonoids: promising anticancer drugs;
- ¹³⁰ P. C. Hollman, M. B. Katan, *Food Chem. Toxicol.*, **1999**, 37, 937 – 942. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability;
- ¹³¹ G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso, *Life Sci.*, **1999**, 65, 337 – 353. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs;
- ¹³² O. J. Bandelet, N. Osheroff, *Biochemistry*, **2007**, 46, 6097 – 6108. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β ;
- ¹³³ K. R. Hande, *Update on Cancer Therapeutics*, **2008**, 3, 13 – 26. Topoisomerase II inhibitors;
- ¹³⁴ A. R. Chowdhury, S. Sharma, S. Mandal, A. Goswami, S. Mukhopadhyay, H. K. Majumder, *Biochem. J.*, **2002**, 366, 653 – 661. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I;
- ¹³⁵ M. R. Webb, S. E. Ebeler, *Biochem. J.*, **2004**, 384, 527 – 541. Comparative analysis of topoisomerase I inhibition as DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity;
- ¹³⁶ B. Le S. Tchize Ndejouong, I. Sattler, H.-M. Dahse, E. Kothe, C. Hertweck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 6473 – 6476. Isoflavones with unusually modified B-rings and their evaluation as antiproliferative agents;
- ¹³⁷ D. F. Birt, S. Hendrich, W. Wang, *Pharmacol. Ther.*, **2001**, 90, 157 – 177. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids;
- ¹³⁸ S. Fazi, H. Siddiqi, A. Naz, S. Bano, *Helv. Chim. Acta*, **2010**, 93, 446 – 481. Specific deuteration in patuletin and related flavonoids via keto – enol tautomerism: solvent- and temperature-dependent ¹H NMR studies;
- ¹³⁹ S. Banerjee, Y. Li, Z. Wang, F. H. Sarkar, *Cancer Lett.*, **2008**, 269, 226 – 242. Mini review: Multi-targeted therapy of cancer by genistein;
- ¹⁴⁰ S. H. Kwon, S. Y. Kim, K. W. Ha, M. J. Kang, J. S. Huh, T. J. Im, Y. M. Kim, Y. M. Park, K. H. Kang, S. Lee, J. Y. Chang, J. Lee, Y. W. Choi, *Arch. Pharm. Res.*, **2007**, 30, 1138 – 1143. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery;
- ¹⁴¹ H. Kim, H.-W. Kim, S. Jung, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29, 590 – 594. Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins;

- ¹⁴² Q.-H. Meng, K. Wähälä, H. Adlercreutz, M. Tikkanen, *Life Sci.*, **1999**, 65, 1695 – 1705. Antiproliferative efficacy of lipophilic soy isoflavone phytoestrogens delivered by low density lipoprotein particles into cultured U937 cells;
- ¹⁴³ A. Kanakubo, K. Koga, M. Isobe, T. Fushimi, T. Saitoh, Y. Ohshima, Y. Tsukamoto, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 8801 – 8805. First finding of daidzein 7-O-phosphate and genistein 7-O-phosphate that are hydrolyzed by sulfatase;
- ¹⁴⁴ G. Gryniewicz, O. Zegrocka-Stendel, W. Pucko, J. Ramza, A. Kościelecka, W. Kołodziejcki, K. Woźniak, *J. Mol. Struct.*, **2004**, 694, 121 – 129. X-ray and ¹³C CP MAS investigations of structure of two genistein derivatives;
- ¹⁴⁵ T. Walle, *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, 10, 5002 – 5019. Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects;
- ¹⁴⁶ M. K. Kim, K. Park, W. Yeo, H. Choo, Y. Chong, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 1164 – 1171. In vitro solubility, stability and permeability of novel quercetin-amino acid conjugates;
- ¹⁴⁷ S. F. Wang, Q. Jiang, Y. H. Ye, Y. Li, R.-X. Tan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 4880 – 4890. Genistein derivatives as selective estrogen receptor modulators: sonochemical synthesis and *in vivo* anti-osteoporotic action;
- ¹⁴⁸ H.-Q. Li, H.-M. Ge, Y.-X. Chen, C. Xu, L. Shi, H. Ding, H.-L. Zhu, R.-X. Tan, *Chem. Biodiver.*, **2006**, 3, 463 – 472. Synthesis and cytotoxic evaluation of a series of genistein derivatives;
- ¹⁴⁹ L.-N. Zhang, Z. P. Xiao, H. Dung, H. M. Ge, C. Xu, H.-L. Zhu, R.-X. Tan, *Chem. Biodiver.*, **2007**, 4, 248 – 255. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel 7-O-modified genistein derivatives;
- ¹⁵⁰ L.-N. Zhang, P. Cao, S.-H. Tan, W. Gu, L. Shei, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 1543 – 1551. Synthesis and antimicrobial activities of 7-O-modified genistein derivatives;
- ¹⁵¹ X.-H. Fu, L. Wang, H. Zhao, H.-L. Xiang, J.-G. Cao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 513 – 517. Synthesis of genistein derivatives and determination of their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide;
- ¹⁵² H.-Q. Li, J.-Y. Xue, L. Shi, S.-Y. Gui, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 662 – 667. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of deoxybenzoin derivatives from genistein;
- ¹⁵³ D. Somjen, N. Stern, E. Knoll, O. Sharon, B. Gayer, T. Kulik, *J. Endocrinol.*, **2003**, 179, 395 – 403. Carboxy derivatives of isoflavones as affinity carriers for cytotoxic drug targeting in adrenocortical H295R carcinoma cells;
- ¹⁵⁴ F. Kohen, B. Gayer, T. Kulik, V. Frydman, N. Nevo, S. Katzburg, R. Limor, O. Sharon, N. Stern, D. Somjen, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 6405 – 6410. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activities of derivative of carboxyalkyl isoflavones linked to N-t-Boc-hexylenediamine;
- ¹⁵⁵ K. Polkowski, J. Popiołkiewicz, P. Krzeczyński, J. Ramza, W. Pucko, O. Zegrocka-Stendel, J. Boryski, J. S. Skierski, A. P. Mazurek, G. Gryniewicz, *Cancer Lett.*, **2004**, 203, 59 – 69. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines;
- ¹⁵⁶ A. Rusin, A. Gogler, M. Głowacka-Kosińska, D. Bochenek, A. Gruca, G. Gryniewicz, J. Zawisza, W. Szeja, Z. Krawczyk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 4939 – 4943. Unsaturated genistein disaccharide glycoside as a novel agent affecting microtubules;
- ¹⁵⁷ A. Rusin, Z. Krawczyk, G. Gryniewicz, A. Gogler, J. Zawisza-Puchałka, W. Szeja, *Acta Biochim. Pol.*, **2010**, 57, 23 – 34. Synthetic derivatives of genistein, their properties and possible applications;
- ¹⁵⁸ A. G. Perkin, F. G. Newbury, *J. Chem. Soc.*, **1899**, 75, 830 – 839. The colouring matters contained in Dyer's Broom (*Genista tinctoria*) and Heather (*Calluna vulgaris*);
- ¹⁵⁹ W. Baker, R. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1928**, 3115 – 3118. Synthetical experiments in the isoflavone group. Part III. A synthesis of genistein;
- ¹⁶⁰ J. Markovits, C. Linassier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J.-M. Saucier, J.-B. Le Pecq, A. K. Larssen, *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5111 – 5117. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II;

- ¹⁶¹ Y. Yoshinori, K. Sho-Zou, N. Hirofumi, *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *39*, 737 – 744. Induction of mammalian topoisomerase ii dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol;
- ¹⁶² R. A. Dixon, D. Ferreira, *Phytochemistry*, **2002**, *60*, 205 – 211. Molecules of interest: genistein;
- ¹⁶³ M. Lopez-Lazaro, E. Willmore, C. A. Austin, *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 763 – 767. Cells lacking DNA topoisomerase II are resistant to genistein;
- ¹⁶⁴ K. H. Cho, J. M. Pezzuto, J. L. Bolton, V. E. Steele, G. J. Kelloff, S. K. Lee, A. Constantinou, *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 2146 – 2156. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity;
- ¹⁶⁵ A. Pelter, R. S. Ward, R. J. Bass, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1978**, 666 – 668. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of isoflavones;
- ¹⁶⁶ J.-E. Kinjo, J.-I. Furusawa, J. Baba, T. Takeshita, M. Yamasaki, T. Nohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *35*, 4846 – 4850. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems;
- ¹⁶⁷ S. Tahara, J. L. Ingham, F. Hanawa, J. Mizutani, *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 1683 – 1689. ¹H NMR chemical shift value of the isoflavone 5-hydroxyl proton as a convenient indicator of 6-substitution or 2'-hydroxylation;
- ¹⁶⁸ P. M. Breton, G. Precogoux, C. Courseille, M. Hospital, *Acta Cryst.*, **1975**, *B31*, 921 – 923. Génisteine;
- ¹⁶⁹ P. C. Yates, *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, **1991**, *231*, 201 – 213. Semi-empirical molecular orbital calculations on tyrosine kinase inhibitors and structurally related compounds;
- ¹⁷⁰ A. P. Mazurek, L. Kozerski, J. Sadlej, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, J. C. Dobrowolski, J. K. Maurin, K. Biniecki, J. Witowska, P. Fiedor, J. Pachecka, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 1223 – 1230. Genistein complexes with amines: structure and properties;
- ¹⁷¹ A. P. Mazurek, J. C. Dobrowolski, J. Sadlej, E. Bednarek, L. Kozerski, *J. Mol. Struct.*, **2000**, *520*, 45 – 52. Genistein complexes with amines. Part II: ab initio study of the complexes with piperazine and triethylamine;
- ¹⁷² L. Kozerski, B. Kamiński, R. Kawęcki, Z. Urbańczyk-Lipkowska, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Zakrzewska, K. T. Nielsen, P. E. Hansen, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 3578 – 3585. Solution and solid state ¹³C NMR and X-ray studies of genistein complexes with amines. Potent biological function of the C-7, C-5 and C-4'-OH groups;
- ¹⁷³ W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, A. Ulkowska, L. Kozerski, *New J. Chem.*, **2006**, *30*, 467 – 472. Interaction of flavonoid topoisomerase i and II inhibitors with DNA oligomers;
- ¹⁷⁴ T. Walle, T. S. Vincent, U. K. Walle, *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 1603 – 1640. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells;
- ¹⁷⁵ F. Boege, T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob, J. Kohrle, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 2262 – 2270. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I;
- ¹⁷⁶ G. Cantero, C. Campanella, S. Matoes, F. Cortes, *Mutagenesis*, **2006**, *21*, 321 – 325. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by flavonoids luteolin and quercetin;
- ¹⁷⁷ M. Lopez-Lazaro, E. Willmore, C. A. Austin, *Mut. Res.*, **2010**, 41 – 47. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerase I and II in cells;
- ¹⁷⁸ M. R. Webb, S. E. Ebeler, *Anal. Biochem.*, **2003**, 3231, 22 – 30. A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation;
- ¹⁷⁹ N. Yamashita, S. Kawanishi, *Free Radic. Res.*, **2000**, *33*, 623 – 633. Distinct mechanism of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin;
- ¹⁸⁰ K. Wüthrich, *NMR of Protein and Nucleic Acids*, **1996**, John Wiley;

- ¹⁸¹ A. S. Altieri, D. P. Hinton, R. A. Byrd, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7566 – 7567. Association of biomolecular systems *via* Pulsed Field Gradient NMR self-diffusion measurements;
- ¹⁸² X. Yang, Y. S. Sanghvi, X. Gao, *J. Biomol. NMR*, **1997**, *10*, 383 – 388. Conformational studies of antisense DNA by PFG NMR;
- ¹⁸³ S. J. Gibbs, C. S. Johnson Jr, *J. Magn. Reson.*, **1991**, *93*, 395 – 402. A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents;
- ¹⁸⁴ W. S. Price, *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, Wiley **2002**, *9*, 364 – 374. Diffusion-based studies of aggregation, binding and conformation of biomolecules: theory and practice;
- ¹⁸⁵ K. Stott, Stonehouse, J., Keeler, J., Hwang, T-L., Shaka, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 4199 – 4200. Excitation sculpting in high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: application to selective NOE experiments;
- ¹⁸⁶ K. Hyz, R. Kawęcki, E. Bednarek, W. Bocian, J. Sitkowski, L. Kozerski, *Magn. Res. Chem.*, **2010**, *575* – 584. Topotecan dynamics, tautomerism and reactivity – ¹H/¹³C NMR and ESI MS study;
- ¹⁸⁷ Kozerski, L., Krajewski, P., Pupek, K., Blackwell, P. G., Williamson, M. P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 1811 – 1818. Towards stereochemical and conformational assignment in flexible molecules using NOEs and molecular modelling;
- ¹⁸⁸ T. Thanh Danh, W. Bocian, L. Kozerski, P. Szczukiewicz, J. Frelek, M. Chmielewski, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 429 – 440. Stereochemistry of the [2+2] Cycloaddition of Chlorosulfonyl Isocyanate to Chiral Alkoxyallenes Derived from 1,3-Alkylidene-L-erythritol and -D-threitol.
- ¹⁸⁹ M. P. Williamson, *Magn. Res. Chem.*, **1987**, 356 - 361. Guidelines for the design of kinetic NOE experiments from computer simulation.
- ¹⁹⁰ R. Aiyama, Nagai, H., Sawada, S., Yokokura, T., Itokawa, H., Nakanishi, M., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1992**, *40*, 2810 – 2813. Determination of self-association of irinotecan hydrochloride (CPT-11) in aqueous solution;
- ¹⁹¹ N. Sanna, G. Chillemi, L. Gontrani, A. Grandi, G. Mancini, S. Castelli, G. Zagotto, C. Zazza, V. Barone, A. Desideri, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 5369 – 5375. UV-Vis spectra of the anticancer camptothecin family drugs in aqueous solution: specific spectroscopic signatures unraveled by a combined computational and experimental study;
- ¹⁹² A. S. Kearney, K. Patel, N. R. Palepu, *Int. J. Pharm.*, **1996**, *127*, 229 – 237. Preformulation studies to aid in the development of a ready-to-use injectable solution of the antitumor agent, topotecan;
- ¹⁹³ H. M. Dodds, D. J. Craik, L. P. Rivory, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *86*, 1410 – 1416. Photodegradation of irinotecan (CPT-11) in aqueous solutions: Identification of fluorescent products and influence of solution composition.;
- ¹⁹⁴ M. Chatterjee, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1690 – 1697. The role of a quinone methide in the sequence specific alkylation of DNA;
- ¹⁹⁵ W. F. Veldhuyzen, Y.-F. Lam, S. E. Rokita, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, *14*, 1345 – 1351. 2'-Deoxyguanosine reacts with a model quinone methide at multiple sites;
- ¹⁹⁶ G. Capranico, M. Palumbo, S. Tinelli, M. Mabilia, A. Pozzan, F. Zunino, *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 1218 – 1230. Conformational drug determinants of the sequence specificity of drug-stimulated topoisomerase II DNA cleavage;
- ¹⁹⁷ W. Bocian, J. Sitkowski, E. Bednarek, A. Tarnowska, R. Kawęcki, L. Kozerski, *J. Biomol. NMR*, **2008**, *40*, 55 – 64. Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution;
- ¹⁹⁸ J. Zielonka, J. Gębicki, G. Gryniewicz, *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *35*, 958 – 65. Radical scavenging properties of genistein;
- ¹⁹⁹ N. R. Srinvas, *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, *23*, 447 – 449. Lack of stability of topotecan in heart tissue homogenates: is it an analytical dilemma or a real phenomenon?
- ²⁰⁰ A. M. Misiór, *Synteza pochodnych genisteiny o zwiększonej rozpuszczalności – praca magisterska*, Akademia Podlaska, Siedlce 2009

- ²⁰¹ K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4199 – 4200. Excitation sculpting in high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: application to selective NOE experiments;
- ²⁰² G. Bodenhausen, H. Kogler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **1984**, 58, 370 – 388. Selection of coherence transfer pathways in NMR pulse experiments;
- ²⁰³ D. J. States, R. A. Haberkorn and D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.*, **1982**, 48, 286 – 292. A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants;
- ²⁰⁴ L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521 – 528. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy;
- ²⁰⁵ C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7870 – 7872. Clean TOCSY for proton spin system identification in macromolecules;
- ²⁰⁶ G. Wider, V. Dötsch, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson. A*, **1994**, 108, 255 – 258. Self-compensating pulsed magnetic-field gradients for short recovery times;
- ²⁰⁷ D. H. Wu, A. D. Chen, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson. A*, **1995**, 115, 260 – 264. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses;
- ²⁰⁸ C. S. Johnson, *Prog. Nucl. Magn. Reson.*, **1999**, 34, 203 – 255. Diffusion ordered NMR spectroscopy: principles and applications;
- ²⁰⁹ B. Antatek, W. Windig, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 10331 – 10332. Generalized rank annihilation method applied to a single multicomponent pulsed gradient spin echo NMR data set;
- ²¹⁰ W. Windig, B. Antatek, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1997**, 37, 241 – 254. Direct exponential curve resolution algorithm (DECRA): A novel application of the generalized rank annihilation method for a single spectral mixture data set with exponentially decaying contribution profiles;
- ²¹¹ T. D. Goddard, D. N. Kneller, SPARKY, University of California, San Francisco;
- ²¹² D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, D. A. Pearlman, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, K. F. Wong, F. Paesani, X. Wu, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, D. H. Mathews, C. Schafmeister, W. S. Ross and P. A. Kollman, AMBER 9, University of California, San Francisco, **2006**;
- ²¹³ A. Onufriev, D. Bashford and D. A. Case, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 3712 – 3720. A modification of the generalized Born model suitable for macromolecules;
- ²¹⁴ B. Xia, V. Tsui, D. A. Case, H. J. Dyson and P. E. Wright, *J. Biomol. NMR*, **2002**, 22, 317 – 331. Comparison of protein solution structures refined in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water.

B. Org. 326/14

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.326/11



90000000128479