

lek. med. Tomasz Kryczka

Estrowe pochodne 2'-deoksyadenozyny oraz kladrybiny
jako potencjalne proleki przeciwnowotworowe

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Paweł Grieb

Zakład Farmakologii Doświadczalnej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. *M. Mossakowskiego* PAN

Warszawa, 2005



H 3886

ZS 254

<http://rcin.org.pl>

*Mojemu Promotorowi
Panu Prof. dr hab. Pawłowi Griebowi
składam serdeczne podziękowania
za inspirację, przekazaną wiedzę,
cierpliwość oraz wszechstronną pomoc
w realizacji niniejszego projektu naukowego*

niniejszą pracę dedykuję Agnieszce

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2CdA	- 2-chloro-2'-deoksyadenozyna (INN: cladribine), kladrybina
2CdA-CLB	- 5'-O-ester kladrybiny i chlorambucylu
2CdA-DP	- difosforan kladrybiny
2CdA-LA	- 5'-O-ester kladrybiny i kwasu (R,S)- α -liponowego
2CdA-MP	- monofosforan kladrybiny
2CdA-TP	- trifosforan kladrybiny
[8- ¹⁴ C]-2CdA	- kladrybina znakowana węglem ¹⁴ C w pozycji 8
[8- ¹⁴ C]-dA	- 2'-deoksyadenozyna znakowana węglem ¹⁴ C w pozycji 8
5'-NT	- (ang. <i>5'-nucleotidase</i> , EC 3.1.3.5) 5'-nukleotydaza
ADA	- (ang. <i>adenosine deaminase</i> , EC 3.5.4.4) dezaminaza adenozykowa
AK1, AK2	- preparaty 5'-O-estrowe kladrybiny i kwasu poli(R,S- β -hydroksymasłowego) o różnej średniej liczbie merów łańcucha polimerowego
AZT	- 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyna (INN: zidovudine), zydowudyna
CLB	- kwas N,N-bis(2-chloro-etylo)-p-aminofenylomasłowy (INN: chlorambucil), chlorambucyl
dA	- 2'-deoksyadenozyna
dA-CLB	- 5'-O-ester 2'-deoksyadenozyny i chlorambucylu
dA-LA	- 5'-O-ester 2'-deoksyadenozyny i kwasu (R,S)- α -liponowego
dADP	- (ang. <i>deoxyadenosine diphosphate</i>) difosforan 2'-deoksyadenozyny
dAMP	- (ang. <i>deoxyadenosine monophosphate</i>) monofosforan 2'-deoksyadenozyny
dATP	- (ang. <i>deoxyadenosine triphosphate</i>) trifosforan 2'-deoksyadenozyny
dCF	- 2'-deoksykoformycyna (INN: pentostatine)
dCK	- (ang. <i>deoxycytidine kinase</i> , EC 2.7.1.74) kinaza deoksycytydynowa
DMSO	- (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>) dimetylosulfotlenek
EHNA	- erytro-9-(2-hydrokso-3-nonylo)adenina, nieodwracalny inhibitor ADA
FDU	- 5-fluoro-2'-deoksyurydyna
HL60	- linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej
HPLC	- (ang. <i>high pressure/performance liquid chromatography</i>) wysokociśnieniowa/wysokosprawna chromatografia cieczowa
IC ₅₀	- (ang. <i>inhibitory concentration</i>) stężenie związku hamujące wzrost hodowli komórkowej o 50 %
INN	- (ang. <i>international non-proprietary name</i>) międzynarodowa niezarejestrowana nazwa leku
K562	- linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej

Wykaz skrótów

KJKO	- komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
LA	- (ang. <i>(R,S)-α-lipoic acid</i>) kwas (R,S)- α -liponowy
LDL	- (ang. <i>low-density lipoprotein</i>) lipoproteiny o niskiej gęstości
MOLT4	- linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki T-komórkowej limfoblastycznej
PEG	- (ang. <i>polyethylene glycol</i>) glikol polietylenowy
PHB	- (ang. <i>polyhydroxybutyric acid</i>) kwas poli(β -hydroksymasłowy)
SCID	- (ang. <i>severe congenital immunodeficiency disease</i>) zespół ciężkiego wrodzonego niedoboru odporności
SD	- (ang. <i>standard deviation</i>) odchylenie standardowe

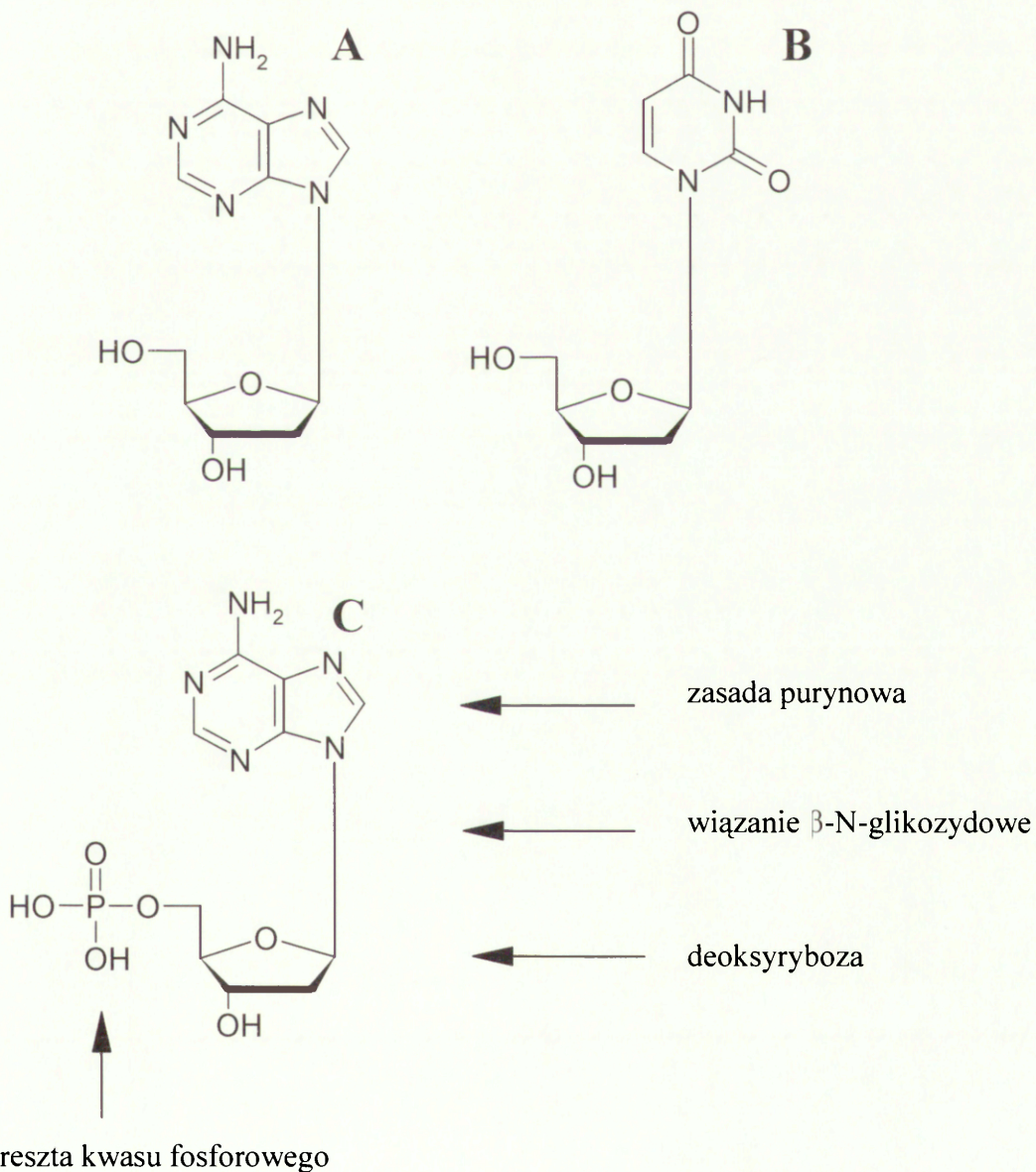
SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. 2'-Deoksyadenozyna i kladrybina (2-chloro-2'-deoksyadenozyna)	9
1.2. Estrowe proleki nukleozydowe	15
1.2.1. Estry zydowudyny (AZT)	17
1.2.2. Inne estry nukleozydowe	18
1.2.3. Polimerowe proleki nukleozydowe	18
1.3. Estrowe pochodne nukleozydowe jako układy dostarczania leków do komórek limfoidalnych – hipoteza robocza	20
1.4. Charakterystyka kwasów karboksylowych wybranych do estryfikacji dA i 2CdA	21
1.4.1. Kwas (R,S)- α -liponowy	21
1.4.2. Chlorambucyl	22
1.4.3. Kwas poli(β -hydroksymasłowy)	23
2. CEL PRACY	25
3. MATERIAŁY I METODY	26
3.1. Substancje chemiczne	26
3.1.1. Odczynniki	26
3.1.2. 5'-O-estry dA i 2CdA z kwasami organicznymi	26
3.2. Materiały biologiczne	29
3.2.1. Osocze krwi	29
3.2.2. Ludzkie komórki jednojądrzaste z krwi obwodowej (KJKO)	29
3.2.2.1. Lizat KJKO	29
3.2.3. Hodowle komórkowe	29
3.3. Metody	30
3.3.1. Metody chromatograficzne	30
3.3.1.1. Badanie czystości i składu 5'-O-estrów i preparatów estrowych	30
3.3.1.2. Badanie stabilności estrów w roztworach wodnych	30
3.3.1.3. Badanie podatności estrów na enzymatyczną hydrolizę	31
3.3.2. Metody radioizotopowe	31
3.3.2.1. Badanie kinetyki wychwytu znakowanej kladrybiny [8- ¹⁴ C]2CdA przez komórki	32
3.3.2.2. Badanie wychwytu [8- ¹⁴ C]dA przez komórki HL60 i MOLT4 preinkubowane z dA-CLB lub związkami macierzystymi	32
3.3.2.3. Badanie wychwytu [8- ¹⁴ C]nukleozydu przez komórki inkubowane z mieszaniną radionukleozydu i substancji badanej	33
3.3.3. Badanie cytotoksyczności estrów i substancji macierzystych	33
3.4. Analiza statystyczna	34
4. WYNIKI	35

4.1. Ocena spektrofotometryczna i chromatograficzna czystości 5'-O-estrów nukleozydowych	35
4.2. Stabilność badanych estrów w roztworach wodnych i ich podatność na enzymatyczną hydrolizę.....	39
4.3. Wychwył [8- ¹⁴ C]2CdA przez komórki nienowotworowe i nowotworowe	47
4.4. Wychwył [8- ¹⁴ C]dA przez komórki HL60 i MOLT4 preinkubowane z dA-CLB lub związkami macierzystymi estru.....	47
4.5. Wychwył [8- ¹⁴ C]nukleozydu przez komórki HL60, MOLT4 i KJKO inkubowane z mieszaninami radionukleozydu i substancji badanej	47
4.6. Toksyczność 5'-O-estrów i związków macierzystych wobec komórek linii nowotworowych, wywodzących się z szeregu białokrwinkowego.....	51
5. DYSKUSJA	61
5.1. Estry dA i 2CdA z niskocząsteczkowymi, cytotoksycznymi kwasami organicznymi	61
5.2. Estry 2CdA z polimerem kwasu (R,S)-β-hydroksymasłowego	70
6. WNIOSKI	74
7. PIŚMIENNICTWO	75
8. STRESZCZENIE	88

1. WSTĘP

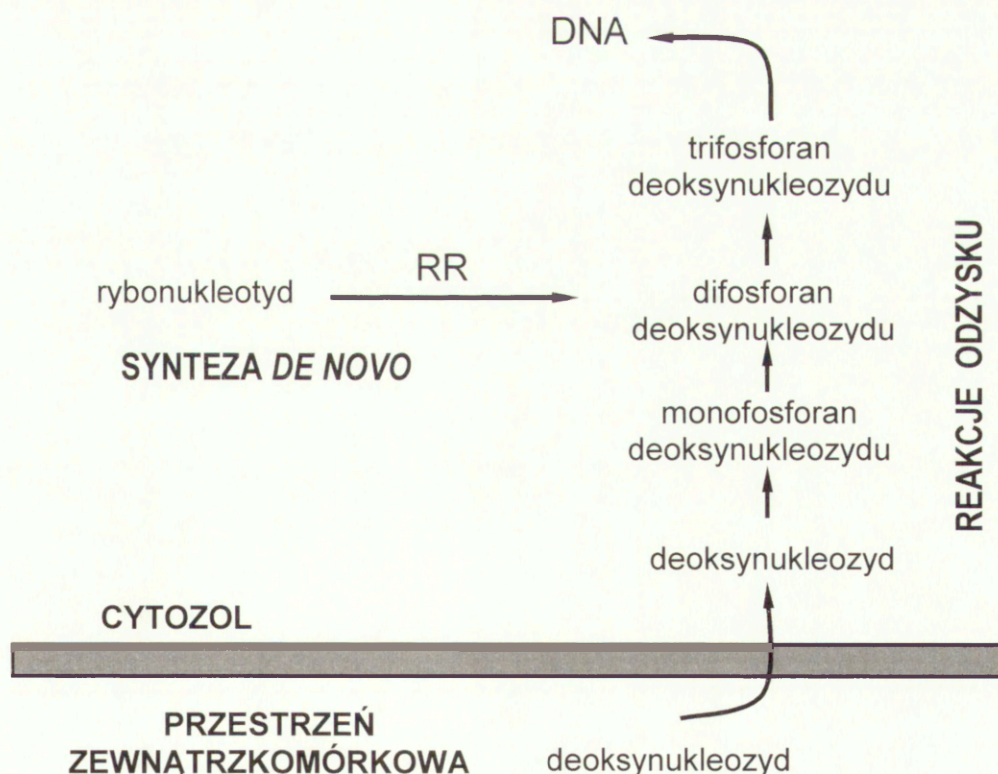
Nukleozydy, substancje zbudowane z pentozy (rybozy lub deoksyrybozy) połączonej wiązaniem β -N-glikozydowym z zasadą purynową lub pirymidynową (**Ryc. 1**), pełnią wiele istotnych funkcji w metabolizmie komórek. W szczególności są one substratami dla syntezy kwasów nukleinowych – DNA i RNA. Synteza DNA zachodzi głównie podczas replikacji komórkowego materiału genetycznego poprzedzającej podział komórki. Natomiast synteza RNA na matrycy DNA, czyli transkrypcja, jest częścią procesu ekspresji genów poprzedzającego translację, czyli syntezę białek.



Ryc. 1. Struktura chemiczna nukleozydów i nukleotydów. Przykłady: 2'-deoksyadenozyna (**A**), 2'-deoksyurydina (**B**), 5'-monofosforan deoksyadenozyny (dAMP) (**C**).

Przed włączeniem w nić kwasu nukleinowego nukleozydy i deoksynukleozydy podlegają trójetapowej fosforylacji, kolejno do mono-, di- i trifosforanów. Fosforany nukleozydów zwane są nukleotydami [189].

Warunkiem prawidłowego przebiegu syntezy DNA jest zrównoważona podaż deoksynukleotydów dATP, dGTP, dCTP i dTTP. Komórki syntetyzują je *de novo*, wykorzystując jako substraty aminokwasy glicynę, kwas asparaginowy i glutaminę, tetrahydrofoliany, dwutlenek węgla oraz ATP jako donora grupy fosforanowej i źródło energii do syntezy. Uzupełniającym źródłem deoksynukleotydów są tzw. szlaki „odzysku”, umożliwiające reutilizację zasad purynowych i pirymidynowych pochodzących z degradacji DNA i RNA oraz przekształcanie rybonukleotydów w deoksyrybonukleotydy w reakcjach katalizowanych przez reduktazę rybonukleotydomową (**Ryc. 2**). Zapotrzebowanie na deoksynukleotydy jest zależne od aktywności podziałowej komórek – ulega zwiększeniu w fazie S cyklu komórkowego, w której zachodzi replikacja DNA [135].



Ryc. 2. Synteza deoksynukleotydów, na podstawie Reichard i wsp. [135]. RR – reduktaza rybonukleotydomowa

Wiele strukturalnych analogów naturalnych nukleozydów wykazuje właściwości cytostatyczne (czyli hamuje proliferację komórek) bądź cytotoksyczne (czyli indukuje śmierć komórek). Dzięki podobieństwu do naturalnie występujących związków takie „falszywe” nukleozydy są transportowane do komórek przez błonowe białka transportujące nukleozydy [5], a następnie fosforylowane przez wewnątrzkomórkowe kinazy [86]. Różnice strukturalne powodują jednak, że falszywe nukleozydy hamują cykl komórkowy i/lub wywołują śmierć komórek na drodze apoptozy. Może to być wynikiem trudności z ich wbudowaniem do nici DNA (trifosforany niektórych nukleozydów są inhibitorami polimeraz DNA), bądź niezdolności utworzenia prawidłowej pary z przeciwległym nukleotydem w podwójnej helisie, co prowadzi do pęknięć nici DNA. Ponadto wiele pochodnych deoksynukleozydowych hamuje enzymy biorące udział w syntezie *de novo* lub reutilizacji deoksyrybonukleozydów – to zaś prowadzi do niedoboru lub nadmiaru tych substancji, a nierównowaga w puli deoksytrifosforanów nukleotydocy jest dla komórek toksyczna. Z reguły pochodne nukleozydowe działają totoksycznie na komórki za pomocą więcej niż jednego mechanizmu.

Cytostatyczne i cytotoksyczne pochodne nukleozydowe wykorzystuje się w leczeniu chorych na nowotwory złośliwe [86]. Transformacja nowotworowa jest wynikiem akumulacji mutacji prowadzących do zaburzeń równowagi metabolicznej i regulacji procesów proliferacji/różnicowania. Istotą procesu nowotworowego jest nieprawidłowa proliferacja komórek, a charakterystycznymi cechami komórek nowotworowych są zwiększone tempo syntezy deoksyrybonukleozydów i DNA, oraz zmniejszona aktywność enzymów degradujących nukleozydy [83]. Ponieważ szybkość syntezy nukleozydów, nukleotydocy i DNA jest w komórkach nowotworowych zwiększona, przeciwnowotworowe pochodne nukleozydowe są wobec nich bardziej toksyczne, niż wobec prawidłowych komórek organizmu. Stwarza to możliwość preferencyjnej eliminacji komórek nowotworowych. Wiele pochodnych nukleozydowych znalazło już zastosowanie w medycynie jako leki przeciwnowotworowe, a szereg dalszych jest przedmiotem badań przedklinicznych i oceny klinicznej. Najbardziej znane cytotoksyczne nukleozydy wymienione są w Tabeli I.

1.1. 2'-Deoksyadenozyna i kladrybina (2-chloro-2'-deoksyadenozyna)

2'-Deoksyadenozyna (dA) (**Ryc. 1**) jest naturalnym składnikiem DNA. Nukleozyd ten jest dostarczany do wnętrza komórek przez białkowe transportery nukleozydowe. Wewnątrz komórek kinaza deoksytydynowa (dCK) fosforyluje go do monofosforanu (dAMP), a nieswoiste kinazy nukleotydocy przeprowadzają dAMP w di-, a następnie w trifosforan (dADP i dATP). Mimo, że dA jest naturalnym nukleotydem, to jej nadmierne stężenie wewnątrz komórki jest cytotoksyczne [63].

Tabela I. Pochodne nukleozydowe stosowane w leczeniu nowotworów (na podstawie [94; 141; 182])

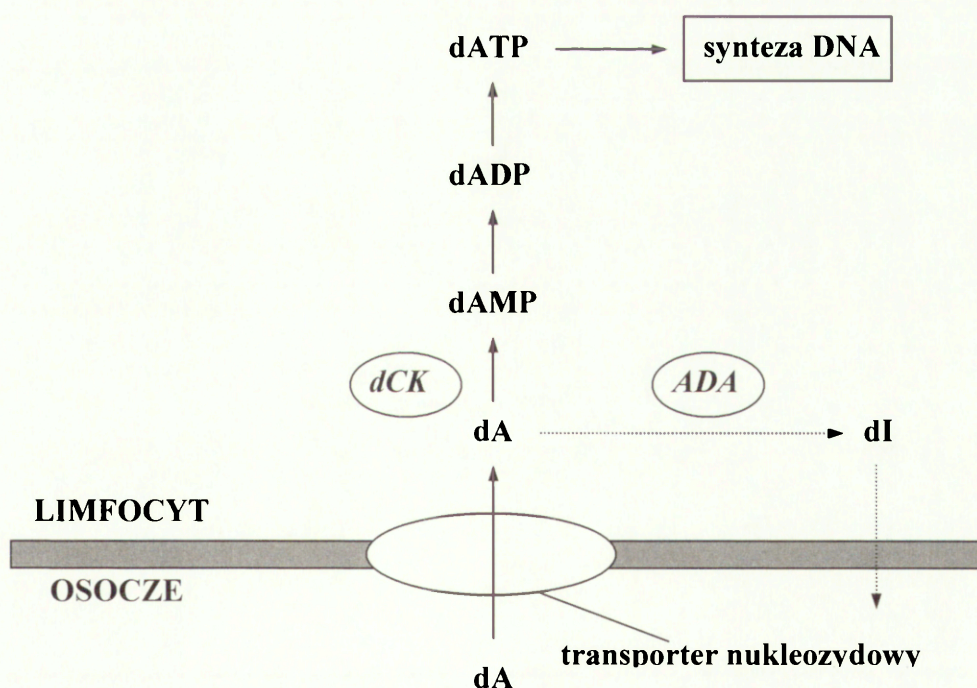
Nazwa chemiczna	INN	Zastosowanie
2-chloro-2'-deoksyadenozyna (2CdA)	cladribine	HCL, CLL, NHL, ALL, CML
2'-chloro-2'-arabinofluoro-2'-deoksyadenozyna (CFA)	clofarabine	AML, CLL, MDS
9-a-D-arabinozyloadenozyna (AraA)	vidaribine	AML
monofosforan 9-β-D-arabinofuranozylo-2-fluoroadeniny (F-AraA)	fludarabine	NHL, CLL, CTCL, HCL
2'-deoksykoformycyna (dCF)	pentostatin	ALL, HCL, CLL, NHL, CTCL
9-β-D-arabinofuranozyloguanina (AraG)		ALL
2-amino-9-β-D-arabinofuranozylo-6-metoksy-9H-guanina	nelarabine	ALL, CLL
9-β-D-arabinozylocytozyna (AraC)	cytarabine	AML , nowotwory jajników
2',2'-difluorodeokscytydina (dFdC)	gemcitabine	chłoniaki, rak trzustki , rak piersi, nowotwory płuc i jajników
(-)-2'-deoksy-3'-oksycytydina	troxacitabine	AML, MDS, CML, rak trzustki
(E)-2'-deoksy-2'-(fluorometyleno)-cytydina (FMdC)	tezacitabine	rak jelita grubego, ALL, AML,
5-azacytydina (AZA)		AML
5-fluorouracyl (5-FU)		rak trzustki, rak piersi, nowotwory głowy i szyi
5-fluoro-2'-deoksyurydina (FDU)		rak trzustki, rak piersi, nowotwory głowy i szyi
karbaminian 5-fluorouracylu	capecitabine	rak okrężnicy , rak piersi

ALL-ostra białaczka limfoblastyczna; AML-ostra białaczka szpikowa; CLL-przewlekła białaczka limfoblastyczna; CML-przewlekła białaczka szpikowa; CTCL-skórna T-komórkowa białaczka/chłoniak; HCL-białaczka włochatokomórkowa; INN-(ang. *international non-proprietary name*) międzynarodowa niezastrzeżona nazwa leku; MDS-zespół mielodysplastyczny; NHL-chłoniak niezziarniczny. Czcionką pogrubioną zaznaczono choroby, w których dana pochodna nukleozydowa jest lekiem z wyboru; czcionką standardową zaznaczono choroby, w przypadku których dana pochodna nukleozydowa wykazuje aktywność przeciwnowotworową lub jest poddawana próbom klinicznym.

Toksyczność dA ma miejsce m. in. w rzadko występującym zespole ciężkiego wrodzonego niedoboru odporności (ang. *Severe Congenital Immunodeficiency Disease, SCID*). Schorzenie to charakteryzuje się prawie zupełnym brakiem limfocytów, prowadzącym do śmierci.

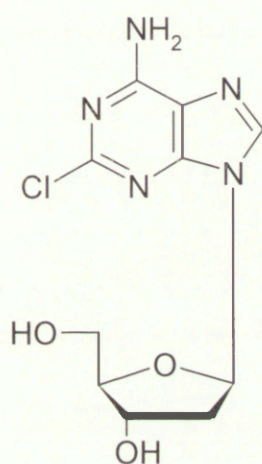
Na początku lat 70-tych Giblett i wsp. [64] powiązali SCID z wrodzonym niedoborem aktywności dezaminazy adenozynej (ADA) w limfocytach. W przeciwieństwie do innych komórek organizmu, limfocyty nie dostosowują tempa fosforylacji dA do zapotrzebowania związanego z tempem syntezy DNA, lecz pobierają i fosforylują ją w sposób ciągły. W normalnych limfocytach nadmiar dA jest dezaminowany przez ADA do 2'-deoksyinozyny, która następnie jest usuwana z komórek (**Ryc. 3**). W SCID niedobór ADA powoduje nadmierną akumulację fosforanów dA w limfocytach, prowadzącą do ich wybiórczej eliminacji.

Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za selektywną eliminację limfocytów u dzieci ze SCID nasunęło pomysł wykorzystania farmakologicznego „modelu” tego schorzenia do leczenia chorób limfoproliferacyjnych, takich jak białaczki limfatyczne i złośliwe chłoniaki. Ponieważ choroby te polegają na rozroście nowotworowo zmienionych limfocytów, zastosowanie inhibitora ADA powinno powodować wybiórczą eliminację chorych komórek [13]. Zgodnie z tymi przewidywaniami 2'-deoksykoformycyna (dCF), pochodna nukleozydowa będąca nieodwracalnym inhibitorem ADA, okazała się wybiórczo toksyczna wobec limfocytów [132].



Ryc. 3. Metabolizm 2'-deoksyadenozyny (dA); dI – 2'-deoksyinozyna; dAMP, dADP, dATP – mono-, di-, trifosforan 2'-deoksyadenozyny; ADA – dezaminaza adenozynej; dCK – kinaza deoksytydynowa; DNA – kwas deoksyrybonukleinowy.

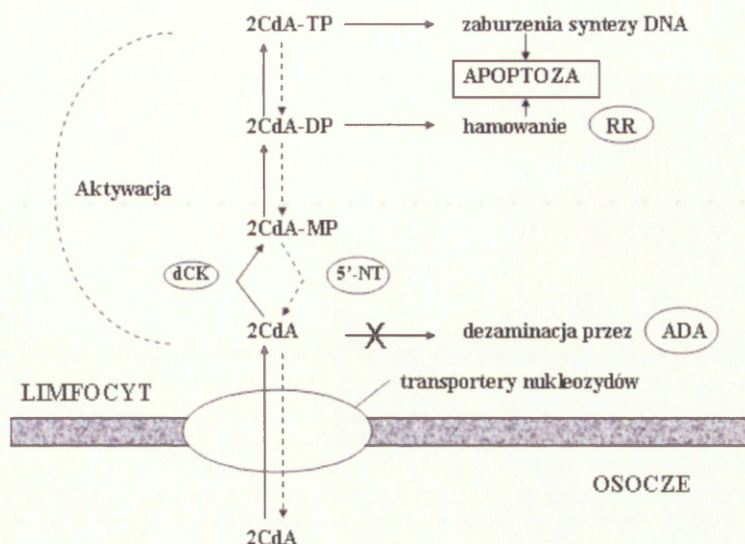
Kladrybina (INN: cladribine) jest nazwą farmaceutyczną 2-chloro-2'-deoksyadenozyny (2CdA) (**Ryc. 4**). Substancja ta jest analogiem dA zawierającym w pozycji 2 pierścienia purynowego atom chloru zamiast atomu wodoru. Po raz pierwszy została zsyntetyzowana w roku 1972 przez Christensena i wsp. [40], którzy zaobserwowali jej aktywność cytotoksyczną wobec komórek mysiej białaczki L1210 *in vitro*. Choć jest 'fałszywym' nukleozydem, który od 2'-deoksyadenozyny różni się tylko jednym atomem, kladrybina jest wybiórczo toksyczna wobec limfocytów. 2CdA jest znacznie słabszym niż dCF inhibitorem ADA [188], ale nie jest przez ten enzym dezaminowana [31].



Ryc. 4. Struktura chemiczna 2-chloro-2'-deoksyadenozyny.

Na szczególną uwagę zasługuje wydajna fosforylacja tego nukleozydu przez dCK [98] (oraz, w mniejszym stopniu, przez mitochondrialną kinazę deoksyguanozynową [187]) do monofosforanu (2CdA-MP), a następnie przez niespecyficzne kinazy nukleotydowe do di- i trifosforanu (2CdA-DP i 2CdA-TP) [29]. Prowadzi to do akumulacji fosforanów kladrybiny wewnątrz limfocytów (**Ryc. 5**). Po ekspozycji limfocytów na 2CdA sumaryczne wewnątrzlimfocytarne stężenie kladrybiny i jej fosforanów kilkusetkrotnie przewyższa zewnątrzkomórkowe stężenie leku [104]. Czynnikiem decydującym o wybiórczej toksyczności kladrybiny wobec limfocytów jest szczególnie wysoka aktywność dCK w tych komórkach [13; 166]. Według niektórych autorów istotną rolę odgrywa także stosunkowo niska aktywność limfocytarnej 5'-nukleotydazy (5'-NT), enzymu defosforylującego 2CdA-MP do 2CdA [98].

Właściwością odróżniającą 2CdA od większości innych cytotoksycznych pochodnych nukleozydowych jest także to, że działa toksycznie zarówno na limfocyty pobudzone



Ryc. 5. Metabolizm wewnątrzkomórkowy kladrybiny. 2CdA – kladrybina; ADA – dezaminaza adenozynowa; dCK – kinaza deoksycytydynowa; 5'-NT – 5'-nukleotydata; RR – reduktaza rybonukleotydyowa; 2CdA-MP, 2CdA-DP, 2CdA-TP, 5'-fosforany kladrybiny.

(proliferujące, replikujące DNA), jak i spoczynkowe [26]. W komórkach proliferujących difosforan 2CdA hamuje reduktazę rybonukleotydyową, przez co zaburza równowagę w puli wewnątrzkomórkowych trifosforanów deoksyrybonukleozydowych) [78; 128]. Natomiast trifosforan 2CdA jest inhibitorem polimeraz DNA α i β , co prowadzi do zaburzeń w replikacji DNA [84]. W limfocytach nie dzielących się akumulacja trifosforanu kladrybiny prowadzi do zaburzeń w puli trifosforanów deoksyrybonukleozydowych, czego następstwem są zwiększona częstość pęknięć DNA i aktywacja endonukleaz [26]. Pierwotnie sądzono [30], że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA dochodzi do aktywacji komórkowych procesów naprawczych wyczerpujących zasoby energetyczne komórek, po czym załamanie bilansu energetycznego aktywuje kaskadę procesów prowadzących do śmierci limfocytów. Obecnie wiadomo, że kladrybina powoduje apoptozę limfocytów, i to apoptoza jest procesem zużywającym energię [23].

Kladrybina jest lekiem z wyboru w leczeniu białaczki włochatokomórkowej – jeden do trzech kursów leczenia pozwala uzyskać u ponad >90% chorych remisję całkowitą o wieloletnim czasie trwania [142]. 2CdA jest także aktywna wobec chłoniaków nawracających [152] i o niskim stopniu złośliwości [56], a w przewlekłej białaczce limfatycznej B-komórkowej jest uznanym lekiem drugiego rzutu, pozwalającym uzyskać

remisje u części pacjentów z nowotworami pierwotnie lub wtórnie opornymi na leczenie [140]. Pojedyncze obserwacje kliniczne wskazują na celowość stosowania tego leku w ostrej i przewlekłej białaczce szpikowej [141], wariacie skórny przewlekłej białaczki limfatycznej [139]. Interesującym przedmiotem badań jest również skuteczność kladrybiny w leczeniu niektórych chorób autoimmunologicznych (m.in. stwardnienia rozsianego) [14; 43; 50; 75; 127; 149; 191].

W schorzeniach hematoonkologicznych próbowano stosować także kombinacje kladrybiny z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Wyniki były niejednoznaczne. Stosując kladrybinę z mitoksantronem uzyskano u pacjentów z lekoopornymi chłoniakami efekty synergistyczne przy akceptowalnej toksyczności obwodowej [157]. Taka kombinacja leków okazała się jednak nieskuteczna w leczeniu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową w fazie blastycznej [148]. Natomiast łączne podawanie zmniejszonych dawek kladrybiny i mitoksantronu przyniosło zdecydowanie lepsze efekty terapeutyczne u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi o niskim stopniu złośliwości, niż podawanie każdego z tych leków oddzielnie [153].

Doświadczenia *in vitro* wskazywały na możliwość spotęgowania apoptozy, wywołanej w komórkach przewlekłej białaczki B-komórkowej przez 2CdA, przez skojarzenie tego nukleozydu z cytotoksycznymi antracyklinami [167]. Jednakże zastosowanie kombinacji kladrybiny z daunorubicyną w nawrotowej lub odpornej na leczenie ostrej białaczce szpikowej nie było bardziej efektywne niż leczenie samą kladrybiną [180]. W doświadczeniach *in vitro* zaobserwowano efekt addytywny działania 2CdA i innej pochodnej nukleozydowej, gemcytabiny, wobec komórek nowotworowych [102]. W badaniach klinicznych w zaawansowanych postaciach różnych chorób hematoonkologicznych wykazano – choć liczebność pacjentów poddanych badaniom nie pozwalała na sformułowanie ogólnych wniosków – korzyści płynące z łącznego stosowania tych dwóch nukleozydów [120]. Zachęcające wyniki uzyskano również kojarząc 2CdA z cytarabiną (także pochodną nukleozydową). Kombinacja ta przyniosła lepsze efekty leczenia niż odpowiednie monoterapie u pacjentów pediatrycznych [41; 58], podobnie jak skojarzenie 2CdA z AraC i idarubicyną u pacjentów w podeszłym wieku [95] z ostrą białaczką szpikową. Zaobserwowano również, że dodanie kladrybiny (w dniach 1-5 każdego cyklu) do protokołu DA-7 terapii ostrej białaczki szpikowej (polegającego na podawaniu daunorubicyny i cytarabiny odpowiednio przez 3 i przez 7 dni) zwiększa odsetek pacjentów z całkowitą remisją choroby [87]. Leczenie kladrybiną i cytarabiną okazało się jednak nieskuteczne u dzieci z nawrotową lub oporną na leczenie postacią ostrej białaczki szpikowej [151]. W leczeniu pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną zachęcające wyniki otrzymano łącząc kladrybinę z lekami alkilującymi – cyklofosfamidem [118; 145; 169] bądź chlorambucylem [168]. Podobnie

obiecujące rezultaty uzyskano stosując 2CdA z cyklofosfamidem i prednizonem w leczeniu niektórych białaczek o niskiej złośliwości [101] lub stosując kladrybinę z prednizonem u leczonych i nieleczonych pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną [146]. Niedawno opublikowane wyniki polskich badań klinicznych wskazują, że dobre wyniki przynosi jednoczesne zastosowanie trzech cytostatyków: kladrybiny, mitoksantronu i cyklofosfamidu [144], chociaż skuteczność takiej kombinacji przy wznowie choroby była już zdecydowanie mniejsza [147].

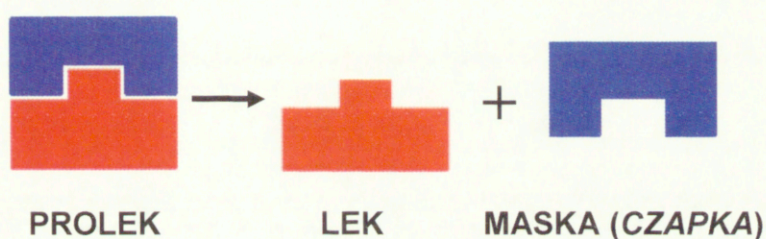
Kladrybina jest toksyczna nie tylko wobec komórek limfoidalnych. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, iż jest ona toksyczna także wobec linii HepG4 hepatomy (pierwotnego raka wątroby) [69], oraz wobec pierwotnych złośliwych nowotworów mózgu (glejaków) [34; 76]. Badania kliniczne nie wykazały jednak skuteczności kladrybiny w leczeniu glejaków, być może ze względu na ograniczoną penetrację nukleozydu przez barierę krew-mózg [133]. Lek ten nie był dotychczas stosowany w leczeniu pacjentów chorych na raka wątroby.

Kladrybina może być podawana dożylnie, podskórną lub doustnie (w zdwojonej dawce, ze względu na konieczność skompensowania częściowego rozkładu leku przez bakterie jelitowe) [105]. Skutki uboczne są zazwyczaj ograniczone do trombocytopenii oraz limfocytopenii i oportunistycznych infekcji związanych z immunosupresyjnym działaniem leku [12; 155]. U pacjentów, którym podawano 2CdA z cyklofosfamidem, zaobserwowano zwiększoną zapadalność na infekcje, zaburzenia immunologiczne i wzrost zapadalności na inne nowotwory, wymagające dodatkowego postępowania terapeutycznego [181]. Zapadalność na wtórne nowotwory złośliwe po leczeniu kladrybiną wobec różnych wyników obserwacji klinicznych [17; 36; 68; 82; 143; 179], jest wciąż przedmiotem dyskusji.

1.2. Estrowe proleki nukleozydowe

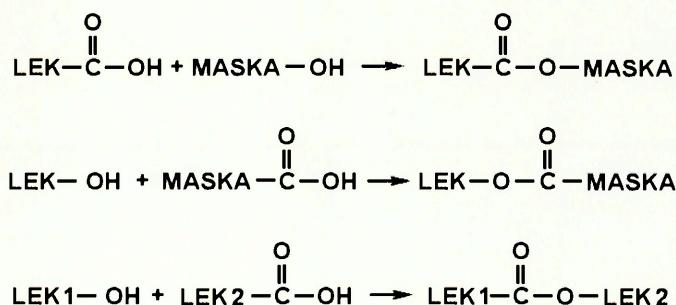
„Prolekami” określa się farmakologicznie nieaktywne pochodne leków (tj. substancji farmakologicznie aktywnych) powstałe po przyłączeniu do nich (przy pomocy wiązania kowalencyjnego) innych substancji. Po podaniu do organizmu lek uwalniany jest z proleku w wyniku enzymatycznej lub nieenzymatycznej reakcji (np. reakcji hydrolizy) [126]. Koncepcję proleków (zwaną uprzednio także „lekami latencjalizowanymi”, „pochodnymi bioodwracalnymi”, bądź „kongenerami”) zaproponowali w roku 1950 Albert i wsp. [134]. Odpowiednio skonstruowany prolek umożliwić może podawanie dożylnie leku słabo rozpuszczalnego w wodzie albo łatwiejsze przechodzenie leku przez błony komórkowe do wnętrza komórek docelowych, może wydłużyć czas półtrwania leku w osoczu krwi, zwiększyć jego wychwyt przez komórki docelowe, bądź zmniejszyć toksyczność obwodową.

Terminu „prolek” używa się niekiedy również do określenia substancji, która jest farmakologicznie nieaktywna i dopiero w organizmie ulega aktywacji do formy aktywnej w wyniku przemian metabolicznych. Wg takiej rozszerzonej definicji prolekami byłyby więc również cytotoksyczne pochodne nukleozydowe podlegające wewnątrzkomórkowej aktywacji przez fosforylację (np. kladrybina). Jest to jednak niezgodne z pierwotną koncepcją proleku wg Alberta, którą można obrazowo określić jako „lek w czapce” [134], albo „lek w masce” [115] (**Ryc. 6**).



Ryc. 6. Koncepcja „leku w masce (czapce)”

W konstruowaniu proleków jednym z najbardziej popularnych rozwiązań jest tworzenie pochodnych estrowych poprzez przyłączenie „maski” zawierającej grupę karboksylową do leku zawierającego grupę hydroksylową, bądź odwrotnie – leku zawierającego grupę karboksylową do „maski” zawierającej grupę hydroksylową. Zamiast „maski” można zastosować drugi lek – wówczas cząsteczka proleku zawiera dwie cząsteczki farmakologicznie aktywne (**Ryc. 7**). W warunkach fizykochemicznych przeważających w organizmie (roztwór wodny, temperatura 37°C, pH w zakresie 5-8) wiązanie estrowe $R_1-CO-O-R_2$ jest zazwyczaj stabilne, ale podlega łatwej hydrolizie pod wpływem esteraz, których aktywność wewnątrz komórek jest wysoka.



Ryc. 7. Koncepcje syntezy proleków estrowych.

Estryfikacja jest często wykorzystywana do syntezy proleków nukleozydowych, gdyż nukleozydy mają grupy hydroksylowe, a niektóre z nich (szczególnie grupa –OH w pozycji 5') dość łatwo poddają się estryfikacji. Przykładem estrowych proleków nukleozydowych są estry zydowudyny (AZT).

1.2.1. Estry zydowudyny (AZT)

AZT (3'-azido-2',3'-dideoksytymidyna, INN: zidovudine) jest inhibitorem odwrotnej transkryptazy wirusów HIV (ang. *human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności) i pierwszym lekiem, który znalazł praktyczne i powszechne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu AIDS (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*, zespół nabytego niedoboru odporności) [16]. Skuteczność AZT jest jednak ograniczona, m.in. dlatego, że jako substancja hydrofilna ma trudności z przechodzeniem przez bariery biologiczne, zwłaszcza przez barierę krew-mózg. Zsyntetyzowano wiele proleków AZT, wśród których najliczniejszą grupę (ponad 200) stanowią estry, omówione w monograficznej pracy Paranga [126]. Są wśród nich estry kwasów karboksylowych które są hydrolizowane do AZT, oraz estry fosforanowe hydrolizowane do monofosforanu AZT (AZT-MP).

Dla przykładu, AZT estryfikowano kwasami rozpuszczalnymi w tłuszczach dla uczynienia cząsteczki lipofilową i – co za tym idzie – nadania jej zdolności penetracji przez bariery biologiczne. Po estryfikacji długołańcuchowymi nienasyconymi kwasami alifatycznymi (takimi jak kwas retinoilowy, czy γ -linolenowy) oprócz polepszenia penetracji leku przez błony komórkowe uzyskano wzmocnienie przeciwwirusowej aktywności AZT. Estryfikacja AZT aminokwasami miała na celu zwiększenie wychwytu nukleozydu przez komórki docelowe poprzez wykorzystanie układu aktywnego transportu aminokwasów [126]. W celu zwiększenia penetracji leku przez barierę krew-mózg skonstruowano tzw. „system chemicznego dostarczania leku” (ang. *chemical drug delivery system*), którym był ester AZT i kwasu 1,4-dihydro-1-metylo-3-nikotynowego – substancji, która przechodzi przez tę barierę w drodze transportu aktywnego [1]. Ten prolek AZT miał wybiórczo gromadzić się w mózgu, ulegając tam hydrolizie i aktywacji – okazał się jednak niestabilny *in vitro* [126].

Aktywacja AZT w komórkach jest, podobnie jak w przypadku kladrybiny, zależna od pierwszego etapu fosforylacji katalizowanego przez dCK. Wprowadzanie do wnętrza komórek monofosforanu AZT pozwoliłoby ominąć ten etap. Jednakże nukleotydy nie przechodzą przez błony komórkowe, a ponadto na powierzchni komórek i w płynach zewnątrzkomórkowych obecne są niespecyficzne enzymy defosfosforylujące [150]. Problem ten rozwiązano przez zsyntetyzowanie innego typu estrowych pochodnych

AZT, a mianowicie estrów monofosforanu AZT. Estry tego rodzaju mogą przechodzić przez błony komórkowe, a AZT-MP jest chroniony przed enzymami defosforylującymi przez drugi składnik przyłączony do grupy fosforanowej [126].

1.2.2. Inne estry nukleozydowe

Kwasami alifatycznymi (w szczególności tłuszczowymi) estryfikowano także inne niż AZT nukleozydy, takie jak syntetyczne nukleozydy o działaniu przeciwwirusowym 3'-fluoro-2',3'-dideoksytymidynę [125] i 1-β-D-arabinofuranozyloouracyl, oraz nukleozydowe leki przeciwnowotworowe 9-β-D-arabinozylocytozynę i 9-α-D-arabinozyloadenozynę [110]. Zsyntetyzowano również triestrową pochodną fosforamidową 2',3'-didehydro-3'-dideoksytymidyny, leku przeciwwirusowego którego skuteczność – podobnie jak AZT – może być ograniczana przez pierwszy etap wewnątrzkomórkowej fosforylacji [154]. Estry fosforamidowe utworzono także z inną pochodną nukleozydową o właściwościach przeciwnowotworowych, 5'-monofosforanem 5-fluoro-2'-deoksyurydyny [55]. Niektóre z estrów tego nukleozydu okazały się bardziej toksyczne od związku wyjściowego wobec komórek mysiej białaczki L1210 [172].

Wchłanianie 5-bromo-2'-deoksyurydyny z przewodu pokarmowego próbowano zwiększyć łącząc ten nukleozyd wiązaniem estrowym z pojedynczymi aminokwasami (alaniną, fenyloalaniną, glicyną, waliną) lub krótkimi peptydami (np. glicylo-glicylo-glicyną) [196]. Podobną pochodną nukleozydową, 5-jodo-2'-deoksyurydynę, estryfikowano m.in. kwasem benzoesowym w celu zwiększenia penetracji leku przez barierę krew-mózg i polepszenia skuteczności leczenia nowotworów mózgu [62]. Zsyntetyzowano również estry 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (FDU) i 2',5-difluoro-2'-deoksyurydyny z kwasami masłowym oraz retinoilowym, substancjami wykazującymi właściwości różnicowania komórek. Przykładem są estry 3'-O-retinoilo-FDU oraz 3'-butyrylo-5'-O-bis(2,2,2-trichloetylo)fosforylo-FDU. Związki te, oprócz cytotoksyczności, wykazywały większą aktywność różnicującą od macierzystych kwasów organicznych wobec komórek ostrej białaczki promielocytowej HL60 [194].

1.2.3. Polimerowe proleki nukleozydowe

Koncepcja proleków będących chemicznymi połączeniami (koniugatami) leków z nietoksycznymi, biokompatybilnymi i biodegradowalnymi polimerami powstała w połowie lat 70-tych [177]. Najszerzej znanymi tego typu koniugatami są modyfikowane polimerami białka lecznicze, takie jak np. pegylowane interferony [7], ale w podobny sposób modyfikuje się także inne leki, w tym leki przeciwnowotworowe [108].

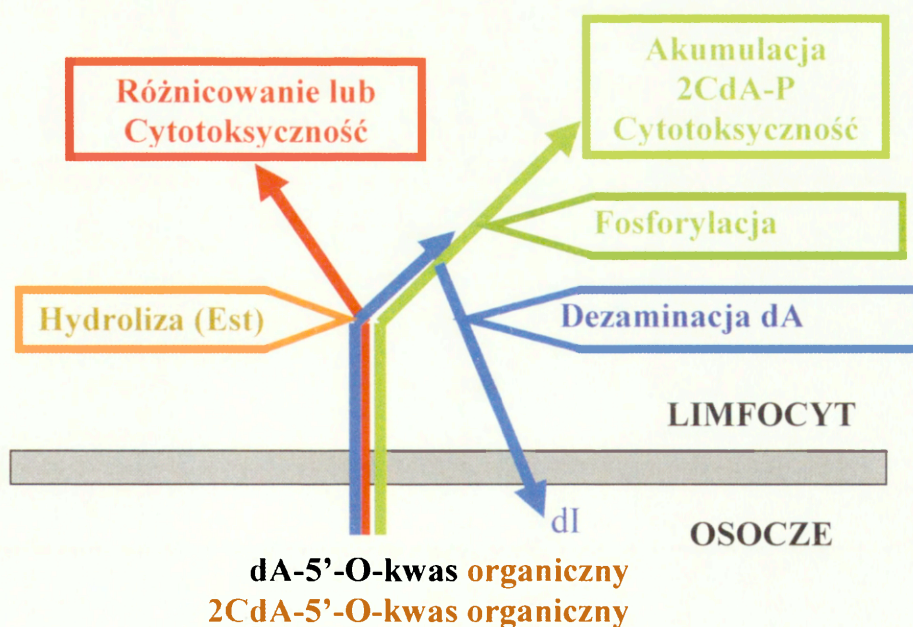
W zależności od właściwości leku i właściwości polimeru można przez ich chemiczne połączenie uzyskać różne efekty. Dla przykładu, przez dołączenie łańcuchowego polimeru rozpuszczalnego w wodzie, takiego jak np. poliglutaminian, można uczynić rozpuszczalnym w wodzie lek silnie lipofilowy, taki jak paclitaxel [103]. Natomiast połączenie polimerowego nośnika z lekiem poprzez wiązanie, które nie ulega rozpadowi w osoczu krwi, może ograniczyć wychwyty koniugatu przez komórkę do drogi pinocytarnej, która dostarcza lek bezpośrednio do jej endosomalnego kompartmentu [44].

Polimerem najczęściej stosowanym do syntez proleków jest glikol polietylenowy (PEG). Ma on marginalną toksyczność, nie powoduje reakcji immunologicznych i jest łatwo eliminowany z organizmu [72]. Przyłączenie PEG (pegylacja) daje pochodne bardziej stabilne w środowisku wodnym. Wydłużeniu ulega okres ich półtrwania w płynach biologicznych, zmniejsza się toksyczność i zwiększa skuteczność działania. Przykładami są białkowe leki pegademaza – pegylowana dezaminaza adenozynowa (stosowana do leczenia SCID), pegaspargaza – pegylowana asparaginaza (stosowana w leczeniu niektórych białaczek) i peginterferon $\alpha 2\beta$, który okazał się znacznie bardziej skuteczny od interferonu niepegylowanego w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C [81].

Pegylację stosowano również do leków przeciwnowotworowych [70]. W szczególności w kilku doniesieniach opisano pegylowane nukleozydy i zasad purynowe oraz pirymidynowe. Pegylowane pochodne 5-fluorouracylu i 1-(β -D-arabinofuranozylo)-cytozyny o różnej długości łańcucha polimerowego w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych były bardziej aktywne przeciwnowotworowo od substancji wyjściowych [37; 38; 160]. Połączenie 5-jodo-2'-deoksyurydyny z PEG dało produkt, który, ze względu na lepszą od nukleozydu macierzystego penetrację przez skórę, może okazać się użytecznym chemoterapeutycznym w leczeniu złośliwych nowotworów skóry [22]. Opisano także syntezę i właściwości kilku pegylowanych pochodnych 6-merkaptopuryny, które były rozpuszczalne w wodzie, a w doświadczeniach na myszach BALB/c, którym wszczepiono podskórnie komórki mysiego mięsaka M109, wykazały aktywność przeciwnowotworową równą lub wyższą od aktywności związku wyjściowego [71]. Inne eksperymentalne polimerowe proleki przeciwnowotworowe to połączenia poliaminokwasów z cytarabiną i polioligosacharydów z 5-fluorouracylem [33; 121; 183]. Interesującą koncepcją proleku są tzw. struktury dendromerowe, zawierające rozgałęzione cząsteczki tworzące sieć wokół rdzenia zawierającego „właściwy” lek. Takie połączenie 5-fluorouracylu z poliamidoaminami zwiększyło wchłanianie tego nukleozydu z przewodu pokarmowego u szczurów [175].

1.3. Estrowe pochodne nukleozydowe jako układy dostarczania leków do komórek limfoidalnych – hipoteza robocza

Estry dA bądź 2CdA mogłyby zostać wykorzystane do selektywnego dostarczania substancji farmakologicznie czynnych o strukturze kwasów karboksylowych do komórek posiadających wysoką aktywność, odpowiednio, dCK i ADA – a więc do komórek limfoidalnych (w tym białaczkowych bądź chłoniakowych). Byłoby to możliwe, gdyby wspomniane estry penetrowały do wnętrza wyżej wspomnianych komórek i ulegały tam hydrolizie uwalniając nukleozyd i kwas karboksylowy. Wówczas uwalniany z estru nukleozyd byłby z środowiska wewnątrzkomórkowego szybko usuwany – dA byłaby dezaminowana przez ADA do 2'-deksyinozyny, natomiast 2CdA byłaby fosforylowana przez dCK. W obu przypadkach usuwanie nukleozydu uwolnionego z estru powinno prowadzić do wewnątrzkomórkowego gromadzenia drugiego produktu hydrolizy – kwasu karboksylowego – i potęgowania jego aktywności. W przypadku estrów 2CdA i kwasów organicznych o właściwościach cytotoksycznych można by również oczekiwać addytywności (lub nawet synergizmu). Te hipotetyczne mechanizmy zilustrowano poniżej (**Ryc. 8**).



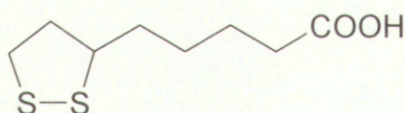
Ryc. 8. Hipoteza robocza. ADA – dezaminaza adenozykowa; dA – 2'-deksyadenozyna; dCK – kinaza deksycydydynowa; dI – 2'-deksyinozyna; Est – esteraza; 2CdA – kladrybina; 2CdA-P – fosforany 2CdA.

1.4. Charakterystyka kwasów karboksylowych wybranych do estryfikacji dA i 2CdA

Do estryfikacji dA i 2CdA wybrane zostały trzy kwasy karboksylowe: chlorambucyl, kwas (R,S)- α -liponowy oraz kwas poli(β -hydroksymastowy). Czynniki, które zadecydowały o wyborze tych substancji były ich właściwości farmakologiczne bądź fizykochemiczne.

1.4.1. Kwas (R,S)- α -liponowy

Kwas (R,S)- α -liponowy (LA) (Ryc. 9) jest disiarczową pochodną kwasu oktainowego, występującą w postaci enancjomerów R(+) i S(-) [112]. LA jest związkiem hydrofobowym, w związku z czym łatwo przechodzi przez błony komórkowe w drodze dyfuzji. Wewnątrz komórek LA wchodzi do mitochondriów, gdzie dehydrogenaza dihydrolipoamidowa redukuje go do kwasu dihydroliponowego (DHLA). LA może ulegać takiej redukcji również pod wpływem reduktazy glutationowej w cytoplazmie. Reduktaza glutationowa jest bardziej aktywna wobec enancjomeru S(-), natomiast dehydrogenaza dihydrolipoamidowa – wobec R(+) [80; 130]. R(+) enancjomer LA w mitochondriach działa jako kluczowy koenzym w oksydacyjnej dekarboksylacji α -ketokwasów (np. kwasu pirogronowego) [80] oraz jako koenzym w enzymatycznym utlenianiu glicyny do dwutlenku węgla i amoniaku [116]. Zarówno LA jak i DHLA są metabolizowane w mitochondriach do nieaktywnych metabolitów [161] i usuwane z komórki.



Ryc. 9. Struktura chemiczna kwasu (R,S)- α -liponowego.

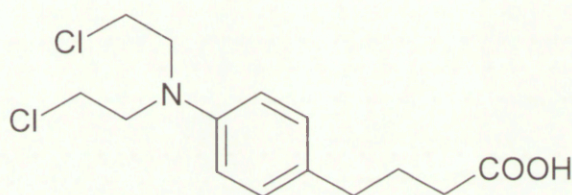
Ze względu na właściwości antyoksydacyjne LA jest stosowany eksperymentalnie w leczeniu chorób, w których patogenezie biorą udział wolne rodniki. M. in. podawany jest pacjentom z niektórymi powikłaniami cukrzycy – polineuropatią, zaćmą i zaburzeniami naczyniowymi [123].

W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że LA w stężeniach ≥ 1 mM aktywuje apoptozę w komórkach ludzkiej ostrej białaczki limfatycznej. Natomiast ekspozycja prawidłowych limfocytów krwi obwodowej na działanie analogicznych stężeń LA powodowała jedynie odwracalne zahamowanie ich cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [122; 178]. Powyższe doniesienia sugerują preferencyjne cytotoksyczne działanie LA na

komórki nowotworowe. Zjawisko to mogłoby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób rozrostowych układu białokrwinkowego pod warunkiem, że udało się osiągnąć milimolarne stężenie LA w osoczu. To należy jednak raczej uznać za niemożliwe, biorąc pod uwagę, że podając doustnie standardową wysoką dawkę LA wynoszącą 600 mg osiąga się maksymalne stężenie w osoczu wynoszące $<10 \mu\text{mol/L}$ [25].

1.4.2. Chlorambucyl

Chlorambucyl (INN: chlorambucil, CLB) jest nazwą farmaceutyczną kwasu N,N-bis-(2-chloroetylo)-p-aminofenylomasłowego (**Ryc. 10**). Substancja ta, zsyntetyzowana po raz pierwszy przez Everetta i wsp. w 1953 r. [51], należy do cytotoksycznych leków alkilujących.



Ryc. 10. Struktura chemiczna chlorambucylu.

CLB, który najczęściej podawany jest doustnie, jest prawie całkowicie metabolizowany w wątrobie na drodze β -oksydacji do również aktywnego metabolitu, iperytu kwasu fenyllooctowego [114]. Ten ostatni penetruje do komórek w drodze dyfuzji biernej, a następnie wchodzi w reakcje z makrocząsteczkami (DNA, RNA, białkami) [53]. Kowalencyjne przyłączenie leku do DNA (preferencyjnie do atomu azotu N7 pierścienia guaniny lub atomu azotu N3 pierścienia adeniny, lub tworzenie wiązań pomiędzy atomami azotu N7 cząsteczek guaniny znajdującymi się na komplementarnych niciach podwójnej helisy DNA) prowadzi do zaburzenia odczytu kodu genetycznego [27; 48], powodując śmierć komórki na drodze apoptozy [8].

Po uzyskaniu zachęcających rezultatów doświadczeń na hodowlach komórkowych i zwierzętach, którym wszczepiano nowotwory różnych typów, CLB już w 1957 r. został zastosowany w badaniach klinicznych [9]. W 1961 r. Galton i wsp., a cztery lata później Ezdlini i wsp., przedstawili wyniki prób leczenia CLB pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną [57] lub chłoniakami [52]. Pozytywne wyniki tych badań spowodowały, że CLB w krótkim okresie czasu stał się jednym z podstawowych leków stosowanych w leczeniu chorób układu białokrwinkowego [124]. Jest on obecnie powszechnie

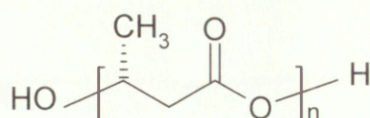
stosowany w leczeniu ziarnicy złośliwej, chłoniaków nieziarnicznych i przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej [54].

CLB próbowano stosować również w leczeniu chorób, w których wyleczenie lub redukcję objawów chorobowych osiąga się poprzez immunosupresję [4; 35; 66; 97; 119; 158; 190; 193]. Jednak raport Międzynarodowej Agencji d/s Badań nad Rakiem z 1987 r. wykazał, że u części osób leczonych chlorambucylem z powodów innych niż choroba nowotworowa rozwijała się ostra białaczka szpikowa [88], a badania na zwierzętach potwierdziły, że lek ten jest silnym karcinogenem [32]. Z tego względu CLB jest lekiem stosowanym głównie u pacjentów w zaawansowanych stadiach chorób nowotworowych.

1.4.3. Kwas poli(β -hydroksymasłowy)

Naturalnie występujący kwas poli(β -hydroksymasłowy) (PHB) jest liniowym polimerem kwasu R- β -hydroksymasłowego (Ryc. 11). Długołańcuchowe PHB (>200 merów) występują w komórkach bakterii, pełniąc funkcję osmotycznie neutralnego rezerwuaru węgla i energii, a ich synteza jest odpowiedzią na suboptymalne warunki dla wzrostu i podziału [107; 159]. Polimery te są biokompatybilne i nietoksyczne [65], dzięki czemu znalazły zastosowanie w medycynie jako składniki implantów lub koloidalne nośniki, w których rozpuszcza się leki do podawania dożylnego lub domięśniowego [99].

Krótkołańcuchowe PHB (<200 merów) występują nie tylko u bakterii, ale również u Eucaryota, w tym u ludzi. Polimery te nazywane są przez niektórych autorów cPHB (ang. *complexed PHB*), gdyż w organizmie tworzą przy pomocy wiązań wodorowych lub koordynacyjnych kompleksy z innymi makrocząsteczkami, np. z białkami [136]. cPHB występują w błonach komórkowych w postaci kompleksów z nieorganicznymi polifosforanami wapnia; struktura i lokalizacja tych kompleksów wskazują na możliwość ich funkcjonowania jako magazynu jonów wapnia, kanału wapniowego lub pompy wapniowo-fosforanowej [136; 137]. W osoczu krwi krótkołańcuchowy PHB tworzy kompleksy z albuminami i lipoproteinami [138].



Ryc. 11. Struktura chemiczna kwasu poli(R- β -hydroksymasłowego).

Nowa propozycja zastosowania kwasu poli(β -hydroksymasłowego) dla celów medycznych polega na łączeniu wiązaniem estrowym syntetycznego krótkołańcuchowego PHB z substancjami farmakologicznie aktywnymi. Założenia tego pomysłu zostały przedstawione w pracach Jedlińskiego i wsp. [91; 131]. Punktem wyjścia było opracowanie nowatorskich sposobów syntezy krótkich łańcuchów PHB, w których jako wyjściowy monomer wykorzystuje się [R,S]- β -butyrylolakton, a jako katalizatory reakcji polimeryzacji – supramolekularne kompleksy metali alkalicznych. W przeciwieństwie do uprzednio znanych metod polimeryzacji β -butyrylolaktonu, metody te umożliwiają otrzymywanie łańcuchów poliestrowych z identycznymi grupami końcowymi jak te, które są obecne w naturalnych łańcuchach cPHB obecnych w żywych organizmach. Tak otrzymane syntetyczne oligomery PHB tworzą, podobnie jak naturalne cPHB, kompleksy z polifosforanami, a umieszczone w sztucznych błonach zachowują się jak kanały jonowe o wysokiej przewodności dla jonów Na^+ i Ca^{+2} [42]. Natomiast jeśli proces polimeryzacji przeprowadzać się będzie w obecności substancji z odpowiednimi grupami funkcyjnymi, otrzyma się estry tych substancji z oligomerami PHB. Przykładami takich pochodnych są wspomniane w pracach grupy Jedlińskiego estrowe koniugaty β -laktamowego antybiotyku penicyliny G [91], oraz cytotoksycznego antybiotyku doksorubicyny z oligomerami PHB [131]. Właściwości tego rodzaju koniugatów nie zostały dotychczas zbadane, ale wspomniani autorzy sugerowali, że mogłyby one stanowić „wektory” dla dostarczania do komórek leków, którym zapewnią wydłużoną aktywność.

2. CEL PRACY

Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy miały na celu ustalenie niektórych właściwości fizykochemicznych i biologicznych nowych estrów 2'-deoksyadenozyny oraz 2-chloro-2'-deoksyadenozyny. Badaniami objęte zostały (i) 5'-O-estry dA i 2CdA z chlorambucylem i z kwasem (R,S)- α -liponowym oraz (ii) 5'-O-estry 2CdA z kwasem poli(R,S)- β -hydroksymasłowym). Na podstawie rozważań teoretycznych (zob. rozdz. 1.2 – 1.4) wysunięto przypuszczenie, że substancje te mogą wykazywać korzystniejsze właściwości przeciwbiałaczkowe (cytostatyczne lub cytotoksyczne), niż ich substancje macierzyste.

Wykonane badania obejmowały:

- a) określenie stabilności w/w estrów w roztworach wodnych i ich podatności na enzymatyczną hydrolizę;
- b) ustalenie, czy estry te wchodzą do komórek, a uwalniane z nich nukleozydy ulegają wewnątrzkomórkowej akumulacji bądź degradacji;
- c) zbadanie i porównanie cytotoksyczności w/w estrów i ich substancji macierzystych wobec wybranych linii komórkowych nowotworów hematologicznych.

Uzyskane wyniki miały posłużyć do selekcji badanych estrów z punktu widzenia celowości dalszych badań w kierunku ich przydatności w praktyce medycznej.

3. MATERIAŁY i METODY

3.1. Substancje chemiczne

3.1.1. Odczynniki

Rozpuszczalniki stosowane w HPLC (ang. *high pressure/performance liquid chromatography*, wysokociśnieniowa/wysokosprawna chromatografia cieczowa) – acetonitryl, DMSO, woda dejonizowana – były o czystości chromatograficznej. Pozostałe substancje używane w doświadczeniach były o czystości analitycznej.

Kładrybina (2CdA) stanowiła dar Fundacji Rozwoju Diagnostyki i Terapii (Warszawa, Polska). Acetonitryl oraz wodę dejonizowaną stosowane do analiz metodą HPLC zakupiono w firmie Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy), Lymphoprep – w firmie AxisShield Poc AS (Oslo, Norwegia), pożywki używane do hodowli komórkowych i płodową surowicę bydlęcą (inaktywowaną w temp. 50 °C, 30 min.) – w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej (Wrocław, Polska) lub firmie Gibco (Grand Island, NY, USA), 1,4-dioksan i glikol etylenowy w firmie Chempur (Piekary Śląskie, Polska), 2,5-difenyloksazol (PPO) i 1,4-di-2-(5-fenyloksazolylo)benzen (POPOP) w MP Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA), płyn do rozpuszczania tkanek NCS-II Tissue Solubilizer – w firmie Amersham Biosciences (Little Chalfont Buckinghamshire, Wlk. Brytania). Wodę destylowaną używaną do celów innych niż chromatografia dejonizowano do oporności właściwej 18 MΩ/cm² w aparacie Milli-Q Plus Water Purification System (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Znakowane radioaktywnie [8-¹⁴C]2CdA (aktywność właściwa: 55 mCi/mmol; stężenie: 0,1 mCi/ml; 519,5 µg/ml; czystość radiochemiczna: 99,8%) oraz [8-¹⁴C]dA (akt. wł.: 56 mCi/mmol; stężenie: 0,1 mCi/ml; 448,6 µg/ml; czystość radiochemiczna: 99,5%) kupiono w firmie Moravек Biochemicals Inc. (Brea, CA, USA).

Pozostałe związki chemiczne i enzymy zakupiono w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.1.2. 5'-O-estry dA i 2CdA z kwasami organicznymi

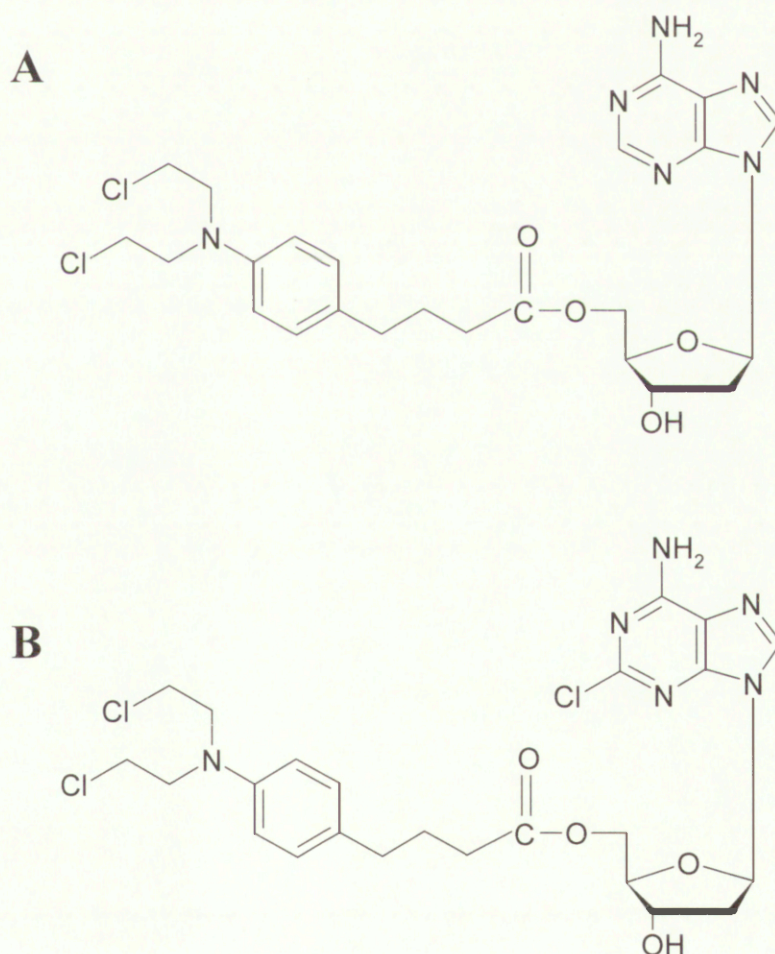
5'-O-estry 2'-deoksyadenozyny i 2-chloro-2'-deoksyadenozyny z chlorambucylem (dA-CLB, 2CdA-CLB) (**Ryc. 12**) oraz kwasem (R,S)-α-liponowym (dA-LA, 2CdA-LA) (**Ryc. 13**) zostały zsyntetyzowane i oczyszczone do >99% przez prof. Z. Kazimierczuka i wsp. ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego – Akademii Rolniczej w Warszawie.

Preparaty AK1 i AK2 będące 5'-O-estrami 2CdA z krótkołańcuchowymi polimerami kwasu (R,S)-β-hydroksymasłowego (**Ryc. 14**) zostały otrzymane od prof. Jedlińskiego i wsp. z Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrze.

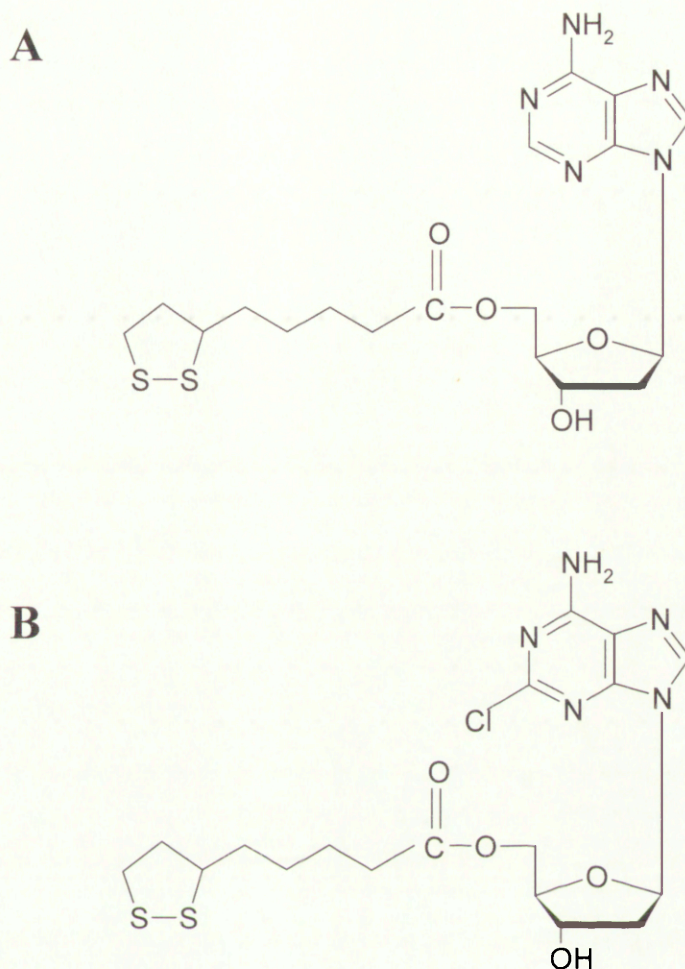
Roztwory podstawowe (o stężeniu 10^{-2} M) badanych estrów oraz ich substancji macierzystych sporządzano w DMSO. Do badań widm w UV używano roztworów otrzymanych przez 100-krotne rozcieńczenie roztworów podstawowych 0,1 M buforem fosforanowym (sodowo-potasowym) o pH 7,4. Pomiary wykonano za pomocą spektrofotometru Helios β (Unicam, Wlk. Brytania).

W przypadku preparatów estrowych AK1 i AK2, roztwory podstawowe o stężeniach 10^{-2} M w DMSO wykonano na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych roztworów wodnych tych preparatów i 2CdA, traktując jako referencyjną absorbancję 2CdA dla 264 nm (PHB i kwas R lub S β -hydroksymasłowy nie pochłaniają światła o tej długości fali).

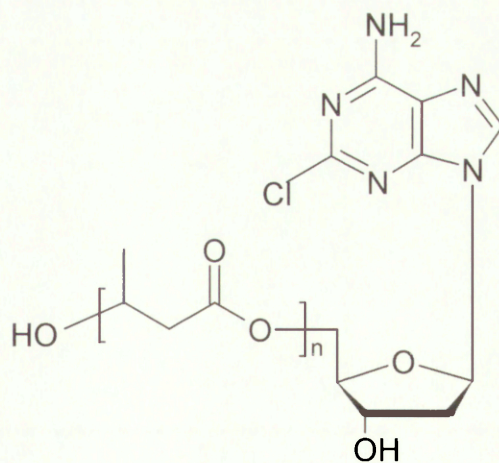
Do eksperymentów z komórkami roztwory te rozcieńczano wstępnie DMSO tak, aby uzyskać to samo stężenie DMSO we wszystkich mieszaninach inkubacyjnych (0,1%).



Ryc. 12. Struktura chemiczna 5'-O-estrów 2'-deoksyadenozyny (panel A) i kladrybiny (panel B) z chlorambucylem.



Ryc. 13. Struktura chemiczna 5'-O-estrów 2'-deoksyadenozyny (panel **A**) i kladrybiny (panel **B**) z kwasem (R,S)- α -liponowym.



Ryc. 14. Struktura chemiczna 5'-O-estru kladrybiny i kwasu poli((R,S)- β -hydroksymasłowego); n – liczba merów kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego;

3.2. Materiały biologiczne

3.2.1. Osocze krwi

Osocze uzyskiwano przez pobranie do heparynizowanej probówki krwi żyłnej zdrowego dawcy (10 ml) i odwirowanie krwinek przy 3000 x g przez 10 minut w temp. 37 °C (wirówka Centra MP4R, IEC, USA). W przypadkach wymagających rozcieńczenia osocza, używano do tego celu 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4.

3.2.2. Ludzkie komórki jednojądrzaste z krwi obwodowej (KJKO)

Krew żylną zdrowego dawcy pobierano do heparynizowanej probówki, mieszano z równą objętością soli fizjologicznej, a następnie nakładano na Lymphoprep (w stosunku 2:1, v/v) w taki sposób, aby uniknąć wymieszania. Tak przygotowaną próbkę wirowano przy 600 x g przez 20 minut w temperaturze 20 °C. Po zakończeniu wirowania widoczną w probówce warstwę pośrednią, zawierającą komórki jednojądrzaste, odpipetowywano, a następnie komórki te przemywano 3-krotnie przez dodanie ok. 9 objętości 0,9% (w/v) NaCl, worteksowanie (worteks Genie-2, Scientific Industries, USA), odwirowanie przy 800 x g przez 10 minut i odrzucenie nadsącza. Przemyte komórki zawieszano w ilości 1,2-1,5 mln/ml w pożywce hodowlanej RPMI-1640 z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10% v/v). Stężenie komórek w zawiesinie oznaczano w komorze hematologicznej Bürkera (Medlab Products, Polska).

3.2.2.1. Lizat KJKO

Lizat przygotowywano do użycia w dniu doświadczenia przez trzykrotne zamrożenie w temperaturze -70 °C, rozmrożenie w temperaturze 37 °C (łaźnia wodna Isotemp 210, Fisher Scientific, USA) i worteksowanie osadu KJKO. Po ostatnim cyklu próbkę wirowano przy 3000 x g przez 10 minut. Osad odrzucano, nadsącz stanowił lizat używany do doświadczeń.

3.2.3. Hodowle komórkowe

Linie ludzkich komórek nowotworowych, tj. ostrej białaczki promielocytowej HL60, przewlekłej białaczki szpikowej K562 oraz ostrej białaczki T-komórkowej limfoblastycznej MOLT4, pochodziły z American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Komórki te hodowano w 37°C, w mieszaninie 95% powietrza i 5% CO₂ (inkubator do hodowli komórkowych ASSAB-3. Assab Ltd., Francja), w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10% v/v) oraz antybiotyków: penicyliny sodowej G (100 U/ml), siarczanu streptomycyny (10 mg/ml) i amfoterycyny B (25 µg/ml). Ilość komórek

w zawiesinie wyznaczano za pomocą aparatu Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

3.3. Metody

3.3.1. Metody chromatograficzne

Do analiz HPLC używano układu chromatograficznego Merck Hitachi LaChrom HPLC System (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japonia), składającego się z autosamplera L-7250, programowalnego detektora L-7420, pompy L-7100 i modemu komputerowego D-7000, połączonych z kolumną chromatograficzną Supelcosil C₁₈ (wielkość ziarna: 5 µm) o wymiarach 250 x 4,6 mm (Supelco Inc., USA). Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl, a przepływ fazy ruchomej – 1 ml/min. Układ chromatograficzny kalibrowano z użyciem standardów zewnętrznych 2CdA i dA. Do analizy danych stosowano oprogramowanie Chromatography Data Station Software version 4.1 (Hitachi Ltd, Japonia).

3.3.1.1. Badanie czystości i składu 5'-O-estrów i preparatów estrowych

Pomiary wykonywano w gradiencie liniowym fazy ruchomej składającej się z wody dejonizowanej (A) i acetonitrylu (B) w odpowiednich stosunkach objętościowych. W czasie t = 0: A – 95%, B – 5%; w 55. minucie: A – 5%, B – 95%; następnie przez kolejne 5 minut układ utrzymywano w fazie izokratycznej. W 60. minucie analizy skład fazy ruchomej zmieniano skokowo do A – 95%, B – 5%; taki skład fazy ruchomej utrzymywano przez następne 10 minut do zakończenia pomiaru. Detekcję prowadzono przy długości fali $\lambda = 256$ nm (dla dA i jej pochodnych estrowych) i 264 nm (dla 2CdA i jej pochodnych estrowych).

3.3.1.2. Badanie stabilności estrów w roztworach wodnych

Do 10 µl roztworu podstawowego estru (10 mM w DMSO) dodawano 990 µl 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4), próbkę mieszano i podgrzewano w łaźni wodnej do temperatury 37 °C. Stężenie wolnego nukleozydu mierzono w odstępach godzinnych metodą HPLC, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę 0,05 M buforu fosforanowego o pH 4,5 i acetonitrylu w stosunku 88:12 (v/v) dla 2CdA i 94:6 (v/v) – dla dA. Detekcję prowadzono przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji 2CdA ($\lambda = 264$ nm) lub dA ($\lambda = 256$ nm).

3.3.1.3. Badanie podatności estrów na enzymatyczną hydrolizę

Do 10 μ l roztworu podstawowego estru dodawano 980 μ l 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4), próbkę mieszano i podgrzewano w łaźni wodnej do temperatury 37 °C. W czasie $t = 0$ do próbki (990 μ l) dodawano 10 μ l roztworu wieprzowej esterazy wątrobowej (EC 3.1.1.1, Sigma) o aktywności 5×10^{-2} j/ml lub 10 μ l lizatu KJKO. Mieszaninę reakcyjną poddawano co godzinę analizie metodą HPLC (zob. rozdz. 3.3.1.2) w celu oznaczenia stężenia wolnego nukleozydu. W przypadku preparatów AK1 i AK2 badano także hydrolizę estrów przy 5×10^{-3} j/ml zawartości esterazy, stosując metodę opisaną w rozdz. 3.3.1.1.

Do badań hydrolizy estrów przez osocze krwi roztwór podstawowy badanego estru w DMSO i osocze krwi (rozcieńczone lub nierozcieńczone) podgrzewano w łaźni wodnej do temperatury 37 °C. W czasie $t = 0$ roztwór podstawowy badanego estru rozcieńczano 100-krotnie osoczem podgrzany do temp 37 °C i nadal inkubowano w temperaturze 37 °C. W godzinnych odstępach z mieszaniny inkubacyjnej odpipetowywano 1 ml próbki roztworu, które odbiałczano przez dodanie 0,5 ml 76 mM roztworu octanu uranylu, wymieszanie i odwirowanie przy 3000 x g przez 10 minut. Następnie z nadsącza usuwano octan uranylu przez dodanie 0,3 ml 100 mM buforu fosforanowego o pH 7,0, wymieszanie i odwirowanie j.w. W nadsącza z tego wirowania oznaczano metodą HPLC (zob. rozdz. 3.3.1.2) stężenie wolnego nukleozydu.

We wstępnych doświadczeniach, w których badano hydrolizę enzymatyczną 5'-O-estrów dA pod wpływem osocza krwi lub lizatu KJKO, stwierdzono na chromatogramach, że stopniowemu zmniejszaniu się piku odpowiadającego estru nie towarzyszy równoczesny ciągły wzrost piku dA. Zamiast tego sygnał odpowiadający dA przejściowo wzrasta, a następnie maleje, co uniemożliwia ilościowy pomiar uwalniania tego nukleozydu z estru. Zjawisko to prawdopodobnie było skutkiem dezaminacji dA przez ADA. Aby mu zapobiec, w dalszych eksperymentach do mieszaniny zawierającej estry dA i esterazy dodawano w nadmiarze swoistego inhibitora ADA, erythro-9-(2-hydroksy-3-nonylo) adeninę (EHNA). Użyteczne stężenie EHNA w mieszaninie reakcyjnej (25 μ M) ustalono biorąc pod uwagę dane literaturowe [6; 67; 170] oraz własne obserwacje z eksperymentów, w których badano degradację dA w osoczu krwi lub lizacie KJKO w różnych stężeniach EHNA.

3.3.2. Metody radioizotopowe

Badane komórki (1,2 -1,5 mln/próbkę) zawieszano w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10% v/v) i umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Do zawiesin komórek dodawano [$8\text{-}^{14}\text{C}$]2CdA lub [$8\text{-}^{14}\text{C}$]dA w ilości odpowiadającej 0,015 μ Ci/ml (0,555 kBq/ml) mieszaniny inkubacyjnej. W celu

oznaczenia radioaktywności nieswoiście wiązanej przez filtr kilka próbek nie zawierających komórek, ale nie różniących się pozostałym składem i sposobem ich obróbki od pozostałych próbek (patrz niżej), poddawano inkubacji z radioaktywnym nukleozydem.

Po zakończeniu inkubacji komórki odfiltrowywano na filtrach z włókna szklanego Whatman GF/B (Whatman International Ltd., Wlk. Brytania) za pomocą próżniowego kolektora do filtracji próbek (Millipore Corp., USA). Filtry płukano roztworem soli fizjologicznej (15 ml), umieszczano w fiolkach scyntylicyjnych (Almed, Polska), a następnie do każdej z próbek dodawano po 200 μ l preparatu rozpuszczającego błony biologiczne (NCS-II Tissue Solubilizer). Po 15 minutach do każdej z fiolek dodawano po 10 ml płynu scyntylicyjnego Bray'a (otrzymanego przez mieszanie do całkowitego rozpuszczenia 60 g naftalenu, 200 mg POPOP, 4 g PPO, 100 ml alkoholu metylowego, 20 ml glikolu etylenowego i 1,4-dioksanu – tym ostatnim uzupełniano objętość mieszaniny do 1 l). Po upływie 12 godzin radioaktywność próbek mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego 1409 LS (Wallac, Finlandia). Ilość radioaktywności związanej przez komórki obliczano odejmując od całkowitej radioaktywności odpowiednich próbek radioaktywność związaną przez filtr.

Ze względu na degradację dA przez ADA obecną w komórkach, we wszystkich doświadczeniach, w których używano estrów dA, dA i/lub $[8-^{14}\text{C}]dA$ – pół godziny przed rozpoczęciem eksperymentu komórki preinkubowano EHNA 25 μM .

3.3.2.1. Badanie kinetyki wychwytu znakowanej kiadrybiny $[8-^{14}\text{C}]2CdA$ przez komórki

W czasie $t = 0$ do umieszczonej w łaźni wodnej (37°C) zawiesiny komórek w pożywce (10 ml) dodawano $[8-^{14}\text{C}]2CdA$. W zadanych odstępach czasu komórki zawarte w 1 ml próbkach mieszaniny inkubacyjnej oddzielano od pożywki na filtrach z włókna szklanego, a następnie postępowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej (zob. rozdz. 3.3.2).

3.3.2.2. Badanie wychwytu $[8-^{14}\text{C}]dA$ przez komórki HL60 i MOLT4 preinkubowane z dA-CLB lub związkami macierzystymi

W czasie $t = 0$ do zawiesiny komórek nowotworowych w pożywce hodowlanej, inkubowanych w łaźni wodnej (37°C), wprowadzano badane substancje (dA, dA-CLB, CLB lub mieszaninę dA i CLB). Końcowe stężenie tych związków w mieszaninie preinkubacyjnej wynosiło 1 μM , zawartość DMSO – 0,1%, a objętość mieszaniny preinkubacyjnej – 1 ml. Próbką kontrolną zawierała zawiesinę komórek nowotworowych w pożywce hodowlanej bez dodatku substancji badanych. Próbki po wymieszaniu

umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 10 minut. Po upływie 10 minut wszystkie próbki przenoszono do lodu, dodawano do nich po 1 ml zimnej (ok. 0°C) pożywki, odwirowywano przy 800 × g przez 5 minut, a nadsącz odrzucano. Osad przemywano trzykrotnie przez zawieszenie komórek w 1 ml zimnej pożywki i odwirowanie j.w. Po ostatnim wirowaniu do osadu komórek dodawano po 1 ml ciepłej pożywki (37°C) i po wymieszaniu umieszczano w łaźni wodnej (37°C) na 10 minut. Następnie do wszystkich próbek dodawano odpowiedniego radioaktywnie znakowanego nukleozydu ([8-¹⁴C]2CdA lub [8-¹⁴C]dA). Próbki po wymieszaniu pozostawiono w łaźni wodnej (37°C) na 30 minut. Po zakończeniu inkubacji komórki oddzielano od pożywki na filtrach z włókna szklanego, a następnie postępowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej (zob. rozdz. 3.3.2).

3.3.2.3. Badanie wychwytu [8-¹⁴C]nukleozydu przez komórki inkubowane z mieszaniną radionukleozydu i substancji badanej

W czasie $t = 0$ do zawiesiny komórek w pożywce (temp. 37°C) wprowadzano badane substancje (nukleozyd lub 5'-O-ester nukleozydu z CLB). Końcowe stężenie tych związków w mieszaninie inkubacyjnej wynosiło 1 μM, zawartość DMSO – 0,1%, a objętość mieszaniny inkubacyjnej – 1 ml. Do próbek kontrolnych (zawiesina komórek w pożywce) dodawano odpowiednią ilość 0,1% roztworu DMSO w wodzie dejonizowanej. W zależności od użytych w eksperymencie nukleozydów (lub ich pochodnych) do próbek dodawano odpowiedni radionukleozyd ([8-¹⁴C]2CdA lub [8-¹⁴C]dA). Próbki po wymieszaniu inkubowano w temperaturze 37°C przez 40 minut. Po zakończeniu inkubacji komórki oddzielano od pożywki na filtrach z włókna szklanego, a następnie postępowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej (zob. rozdz. 3.3.2.).

3.3.3. Badanie cytotoksyczności estrów i substancji macierzystych

Do badań cytotoksyczności używano komórek ludzkiej ostrej białaczki T-komórkowej limfoblastycznej MOLT4, ostrej białaczki promielocytowej HL60 i przewlekłej białaczki szpikowej K562.

Komórki te wprowadzano do 96-studzienkowych płytek (Nunc, Dania) w postaci zawiesin w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10% v/v), w ilości $2,5 \times 10^4$ komórek (dla doświadczeń 48-godzinnych) lub $1,5 \times 10^4$ komórek (dla doświadczeń 96-godzinnych) na studzienkę. W eksperymentach, w których komórki inkubowane były z różnymi stężeniami badanych substancji, roztwory podstawowe tych związków (nukleozydu, 5'-O- estru, kwasu organicznego lub mieszaniny nukleozydu z kwasem organicznym) rozcieńczano odpowiednio pożywką hodowlaną w celu uzys-

kania odpowiedniego końcowego stężenia związku w mieszaninie inkubacyjnej. Całkowita objętość zawiesiny inkubacyjnej wynosiła 100 μ l, a zawartość DMSO – 0,1%. Wszystkie próbki sporządzano w tryplikatach. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C w mieszaninie powietrza (95% obj.) i CO₂ (5% obj.).

Natychmiast po zakończeniu inkubacji do każdej studzienki dodawano 10 μ l roztworu PBS (ang. *phosphate buffer saline*, buforowany roztwór 0,9% NaCl) zawierającego 5 mg/ml bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT), a po dalszych 4 godzinach – 100 μ l 10% roztworu dodecylosiarczanu sodowego w 10 mM HCl i pozostawiano na 16 godzin w inkubatorze (37°C).

Absorbancję próbek mierzono przy długości fali 570 nm i 690 nm za pomocą czytnika PowerWave XS (Biotek, USA). Absorbancję swoistą obliczano odejmując od wartości absorbancji przy $\lambda = 570$ nm wartość absorbancji przy $\lambda = 670$ nm. Przeżywalność komórek mierzono jako stosunek swoistej absorbancji próbek, w których komórki były inkubowane z substancjami badanymi, do swoistej absorbancji próbek kontrolnych.

3.4. Analiza statystyczna

Wyniki wyrażano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe (SD). Znamienność statystyczną różnic między grupami zmiennych określano stosując, w zależności od użytego układu doświadczalnego, test *t*-Studenta dla zmiennych niezależnych lub analizę wariancji (jedno- lub wieloczynnikową) i testy post-hoc (test Dunnetta lub Studenta-Newmana-Keulsa). Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu pakietu oprogramowania statystycznego Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Jako próg istotności przyjęto $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Ocena spektrofotometryczna i chromatograficzna czystości 5'-O-estrów nukleozydowych

Pomiary absorbancji roztworów wodnych badanych estrów i preparatów estrowych wykazały, w przypadku każdej z tych substancji, istnienie w zakresie UV, przy pH 7,4, jednego maksimum absorbancji:

dA-LA – przy $\lambda=260$ nm, dA-CLB – przy $\lambda=260$ nm, 2CdA-LA – przy $\lambda=266$ nm, 2CdA-CLB – przy $\lambda=262$ nm, AK1 i AK2 – przy $\lambda=266$ nm,

Te długości fal są bliskie długościom odpowiadającym maksimum absorbancji macierzystego nukleozydu:

2CdA – $\lambda=264$ nm, dA – $\lambda=256$ nm.

Wszystkie badane substancje poddano następnie analizie HPLC z detekcją UV. Stężenia wszystkich badanych roztworów wynosiły 100 μ M w przeliczeniu na całkowitą zawartość odpowiedniego nukleozydu, a próg detekcji odpowiadał 10^{-6} M stężeniu macierzystego nukleozydu.

Analiza HPLC 5'-O-estrów dA i 2CdA z LA lub CLB nie wykazała obecności zanieczyszczeń nukleozydami.

Analiza HPLC preparatów estrowych AK1 i AK2 wykazała, że oba te preparaty są mieszaninami związków odpowiadających prawdopodobnie estrom o różnej długości łańcucha PHB przyłączonego w pozycji 5'-O- nukleozydu oraz pewnej (zob. poniżej) domieszki macierzystego, niezestryfikowanego nukleozydu. Skład jakościowy obu preparatów był niemal identyczny, różnił się jedynie brakiem związku odp. pikowi IIIb w preparacie AK1. W preparacie AK1 dominującym składnikiem był ester o czasie retencji 19,9 min., na który przypadało niemal 2/3 (62%) całkowitej (tj. obecnej w formie estru lub wolnego nukleozydu) ilości 2CdA, a udział żadnego z pozostałych składników nie przekraczał 14%. W preparacie AK2 udział poszczególnych składników był mniej zróżnicowany, a na ester dominujący pod tym względem (o czasie retencji 27,6 min.) przypadała 1/3 całkowitej ilości 2CdA. Zawartość niezestryfikowanej kladrybiny wynosiła dla AK1 i AK2 odpowiednio $0,9 \pm 0,05\%$ i $1,9 \pm 0,06\%$ (średnia \pm SD, $n=4$) całkowitej zawartości 2CdA w tych preparatach. Na podstawie przeprowadzonych analiz nie było możliwe przyporządkowanie poszczególnym pikom chromatograficznym konkretnej długości łańcucha polimerowego (**Ryc. 15**).

Wg informacji przedstawionej przez wytwórcę estrów kladrybiny z PHB prof. Z. Jedlińskiego, średnia długość łańcucha PHB (N_{GPC}) wyznaczona metodą GPC (ang. *gel permeability chromatography*) wynosiła w preparacie AK1 ok. 5 merów, a w preparacie AK2 ok. 9 merów kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego. Dla weryfikacji

tych danych posłużono się metodą spektrofotometryczną, w sposób opisany poniżej dla przypadku preparatu AK1.

Ani kwas (R,S)- β -hydroksymasłowy, ani jego polimery PHB nie absorbują światła w zakresie UV w okolicach maksimum absorpcji 2CdA tj. przy długości fali ok. 264 nm – a więc absorpcja preparatu AK1 dla tej długości fali musi pochodzić od nukleozydu. Zmierzona chromatograficznie zawartość wolnej 2CdA w preparacie AK1 jest niewielka – można ją więc było zaniedbać i przyjąć, że absorpcja roztworu AK1 przy tej długości fali powodowana jest przez nukleozyd związany z łańcuchami PHB (i ewentualnie przez rozpuszczalnik). Przyjęto także, że przyłączenie łańcucha PHB nie wpływa na wartość współczynnika ekstynkcji molowej 2CdA.

Średnia masa cząsteczkowa AK1 (M_{AK1}) jest sumą masy cząsteczkowej 2CdA (M_{2CdA}) i masy cząsteczkowej łańcucha polimerowego (M_{PHB}):

$$M_{AK1} = M_{2CdA} + M_{PHE} \quad (1)$$

Masa cząsteczkowa łańcucha PHB jest zaś iloczynem liczby merów kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego tworzącego łańcuch polimerowy (N) i masy cząsteczkowej tego kwasu (M_{HB}) od której należy odjąć masę cząsteczkową wody (M_{woda}), gdyż powstanie każdego wiązania estrowego związane jest z ubytkiem jednej cząsteczki H_2O :

$$M_{PHB} = N \times (M_{HB} - M_{woda}) \quad (2)$$

Opierając się na informacji, zgodnie z którą średnia liczba merów kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego w AK1 wynosi $N_{GPC} = 5$, sporządzono roztwór wyjściowy zawierający 7,15 mg preparatu AK1 w 1 ml DMSO, czyli roztwór o stężeniu wagowym preparatu AK1 wynoszącym $m_{AK1} = 7,15 \text{ g/l}$. (Gdyby średnia liczba merów kwasu β -hydroksymasłowego w łańcuchach AK1 rzeczywiście wynosiła 5, to tak sporządzony roztwór miałby stężenie 10 mM.) Następnie ten roztwór rozcieńczono 100-krotnie 0,1 M buforem fosforanowym (sodowo-potasowym) o pH 7,4 i zmierzono jego absorpcję względem ślepej próby odczynnikowej w postaci 1% wodnego roztworu DMSO ($A_{AK1} = 1,334$). Jednocześnie sporządzono 10^{-2} M roztwór 2CdA w DMSO, rozcieńczono go 100-krotnie 0,1 M buforem fosforanowym (sodowo-potasowym) o pH 7,4 i zmierzono jego absorpcję względem tej samej ślepej próby odczynnikowej ($A_{2CdA} = 1,462$).

Znając wartości absorpcji roztworów preparatu AK1 i 2CdA wyliczyć można stężenie molowe estrów 2CdA z PHB w roztworze macierzystym, które wynosi:

$$C_{AK1} = (A_{AK1}/A_{2CdA}) \times 10^{-2} \text{ [M]} \quad (3)$$

W końcu, znając stężenie molowe (C_{AK1}) i wagowe (m_{AK1}) preparatu w roztworze, można w prosty sposób obliczyć jego średnią masę cząsteczkową wyznaczoną spektrofotometrycznie:

$$M_{AK1} = m_{AK1} / C_{AK1} = m_{AK1} / (A_{AK1}/A_{2CdA}) \times 10^{-2} \text{ [g/mol]} \quad (4)$$

Znając M_{AK1} , na podstawie wzorów (1) i (2) można zaś obliczyć średnią długość łańcucha PHB (N):

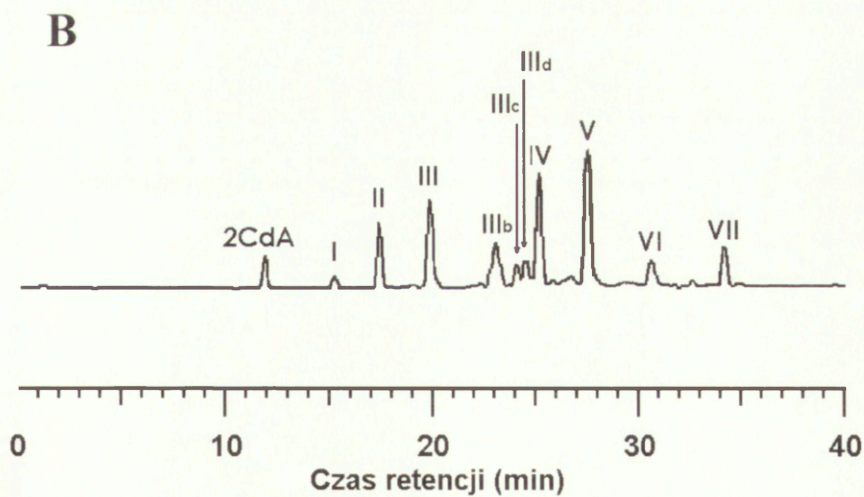
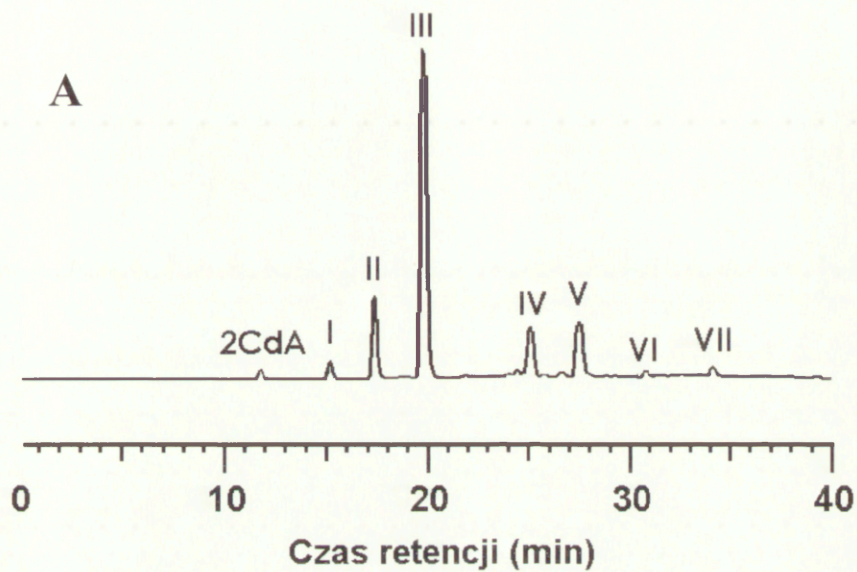
$$N = M_{AK1} - M_{2CdA} / M_{HB} - M_{woda} \quad (5)$$

W identyczny sposób można obliczyć średnią długość łańcucha polimerowego dla preparatu AK2. Wartości uzyskane za pomocą powyższych obliczeń przedstawione są w **Tab. II**.

Tabela II. Wyniki obliczeń przeprowadzonych na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych.

Preparat AK1		Preparat AK2	
m_{AK1}	7,15 g/l	m_{AK2}	10,59 g/l
A_{AK1}/A_{2CdA}	0,9123	A_{AK2}/A_{2CdA}	1,1078
C_{AK1}	$9,1 \times 10^{-2} \text{ M}$	C_{AK2}	$11,07 \times 10^{-2} \text{ M}$
M_{AK1}	784,5 g/mol	M_{AK2}	956,5 g/mol
N_{GPC}	ok. 5 merów	N_{GPC}	ok. 9 merów
$N_{SPEKTR.}$	ok. 5,8 merów	$N_{SPEKTR.}$	ok. 7,8 merów

$N_{SPEKTR.}$ – średnia długość łańcucha polimerowego wyznaczona spektrofotometrycznie; objaśnienia do pozostałych oznaczeń zawarte są w tekście.



Ryc. 15. Chromatogramy HPLC preparatów 5'-O-estrowych kladrybiny z kwasem poli(R,S- β -hydroksymastłowym): AK1 – (panel **A**), AK2 – (panel **B**). Liczbami rzymskimi oznaczono identyfikowane przez układ chromatograficzny estry o różnej długości łańcucha PHB (zob. **Tab. II**). Uwaga: układ chromatograficzny nie oddzielał pików IIIc i III d od pików IV.

4.2. Stabilność badanych estrów w roztworach wodnych i ich podatność na enzymatyczną hydrolizę

Stabilność wodnych roztworów badanych estrów, tj. ich odporność na spontaniczną hydrolizę, była warunkiem wstępnym dla dalszych badań. Wszystkie badane estry i preparaty estrowe okazały się odporne na taką hydrolizę w obserwacji 24-godzinnej (pH 7,4, temp. 37°C) (dane nieprezentowane).

Wszystkie badane związki ulegały hydrolizie w obecności osocza krwi zdrowego dawcy, lizatu KJKO zdrowego dawcy lub esterazy z wątroby wieprzowej. We wszystkich tych przypadkach hydrolizie najszybciej ulegały estry 2CdA i dA z LA. W reakcji katalizowanej przez esterazę wątrobową zawartość niezwiązanego nukleozydu w mieszaninie reakcyjnej po 1 godzinie wyniosła, odpowiednio dla 2CdA-LA i dA-LA, $95,1 \pm 0,6\%$ i $84,4 \pm 1,2\%$ (średnia \pm SD, n=4) całkowitej wyjściowej zawartości nukleozydu w estrze (dane nieprezentowane graficznie).

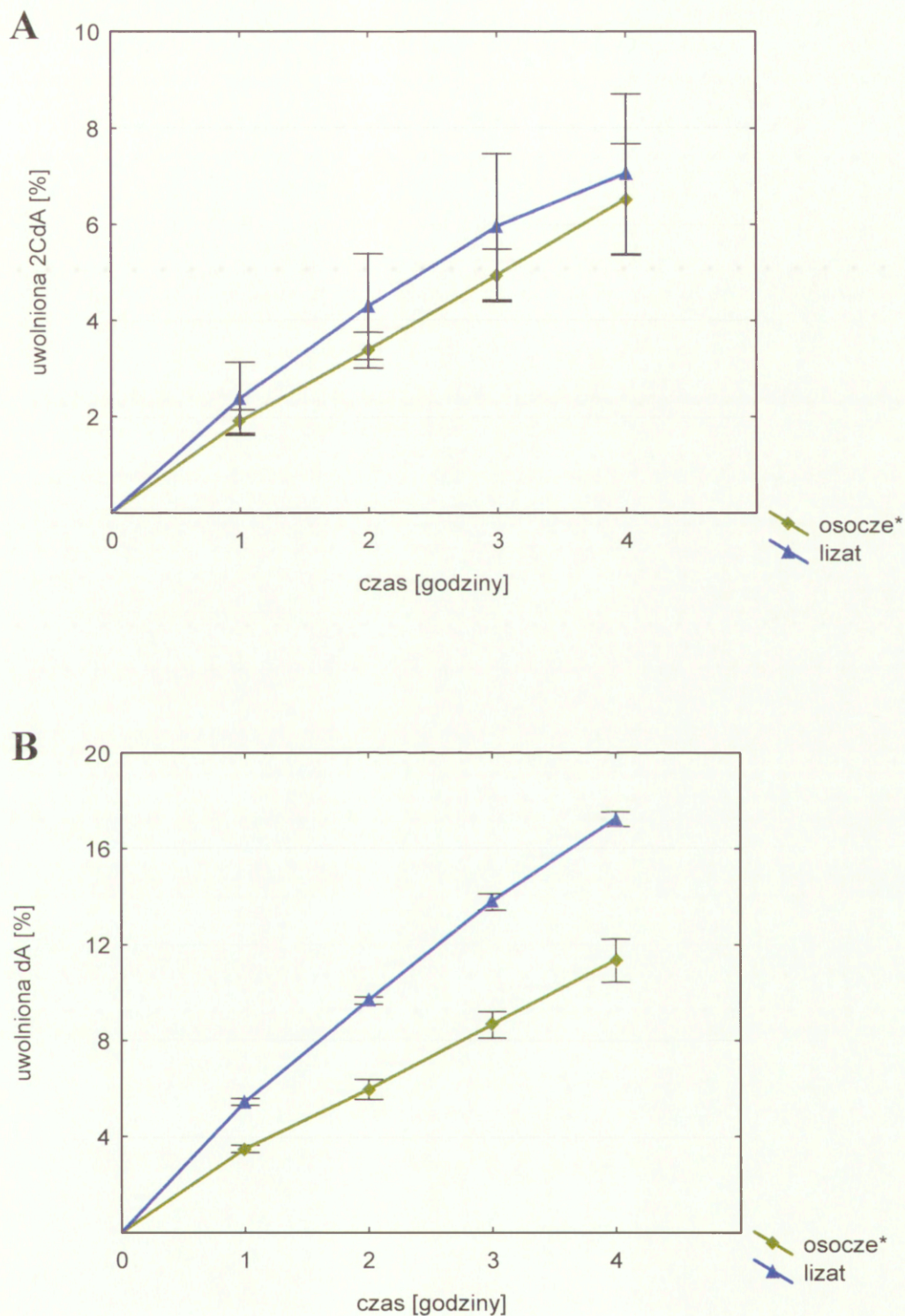
Po 1-godzinnej inkubacji 2CdA-LA lub dA-LA z nierozcieńczonym osoczem krwi zdrowego dawcy stężenie uwolnionego nukleozydu było podobne do stężenia uwalnianego przez wieprzową esterazę wątrobową w stężeniu 5×10^{-4} j/ml. W przypadku inkubacji z lizatem KJKO otrzymanym z takiej samej ilości krwi pełnej zdrowego dawcy z jakiej otrzymano osocze, stężenie dA lub 2CdA uwolnionej po 1 godzinie z odpowiedniego 5'-O-estru z LA było wielokrotnie mniejsze. Aby bliżej porównać kinetykę hydrolizy 2CdA-LA i dA-LA przez osocze krwi i lizat komórek, przeprowadzono eksperymenty porównawcze, używając 1000-krotnie mniejszej ilości osocza. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono na **Ryc. 16**. Tempo wzrostu stężenia wolnego nukleozydu w roztworze 2CdA-LA inkubowanym czy to z osoczem krwi, czy z lizatem KJKO, było wyraźnie niższe, niż w inkubowanym w takich samych warunkach roztworze dA-LA.

Wyniki inkubacji chlorambucylowych 5'-O- estrów dA i 2CdA z esterazą wątrobową, osoczem krwi i lizatem KJKO zdrowego dawcy przedstawiono na **Ryc. 17**. W przypadku inkubacji 2CdA-CLB z wieprzową esterazą wątrobową ilość wolnego nukleozydu w mieszaninie inkubacyjnej wykazywała ciągły wzrost i po upływie 4 godzin odpowiadała $87,6 \pm 0,2\%$ (wartość średnia \pm SD, n=4) wyjściowej zawartości estru. Natomiast w przypadku inkubacji dA-CLB z esterazą wątrobową stężenie wolnego nukleozydu wzrastało znacznie szybciej i po ok. 3 godz. osiągało plateau odpowiadające $94 \pm 0,8\%$ (średnia \pm SD, n=4) wyjściowej zawartości nukleozydu w estrze. W przypadku inkubacji tychże związków z osoczem krwi lub lizatem KJKO zdrowego dawcy wzrost stężenia wolnego nukleozydu po 1-2 godzinach ulegał znacznemu spowolnieniu, osiągając lub wykazując tendencję do osiągnięcia plateau na poziomie nieprzekraczającym 50% wyjściowej

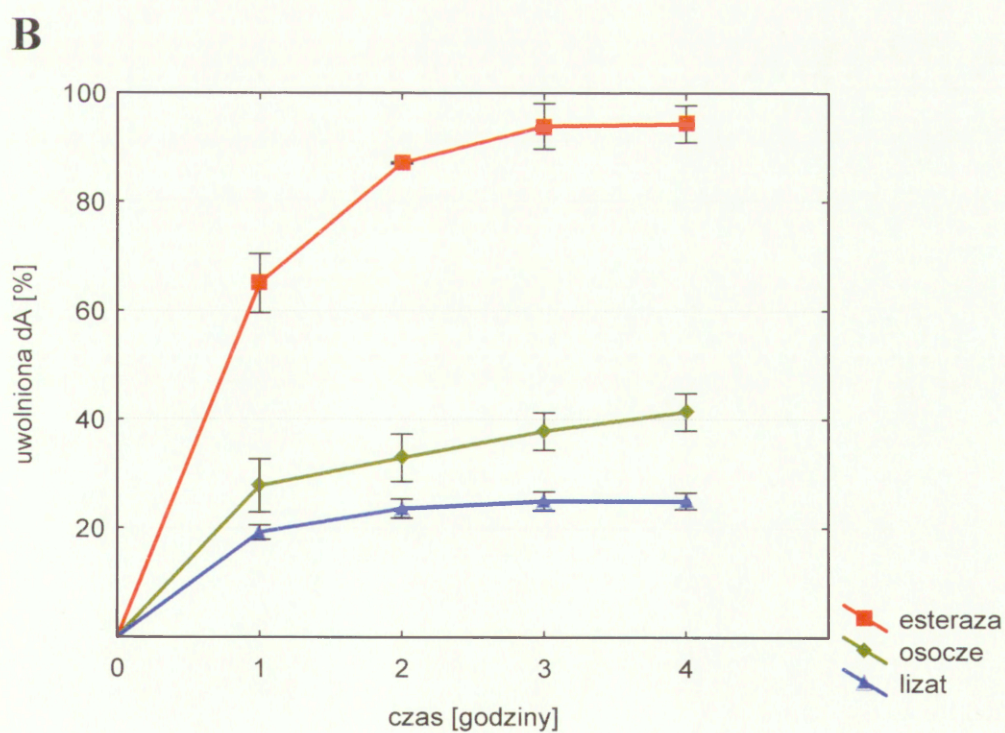
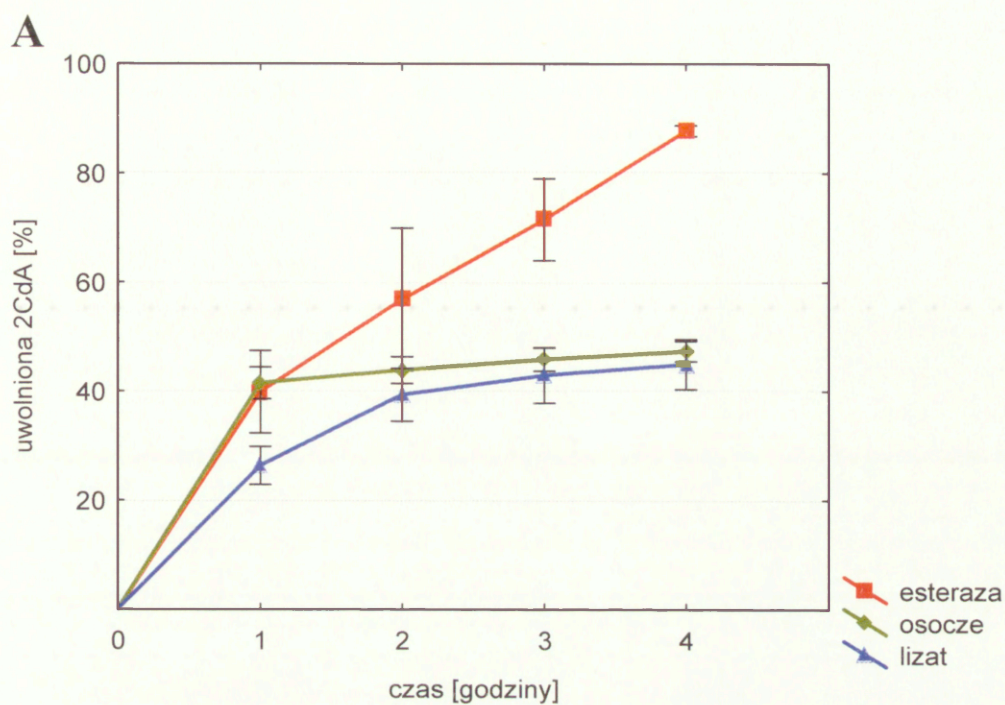
zawartości nukleozydu w estrze, a w przypadku inkubacji dA-CLB z lizatem KJKO znacznie poniżej tej wartości, po 4 godzinach inkubacji.

W preparatach estrowych kładrybiny z PHB inkubowanych z lizatem KJKO lub osoczem krwi stężenie wolnej 2CdA po 4 godzinach inkubacji ulegało jedynie nieznacznemu wzrostowi. Znacznie szybszy wzrost stężenia wolnego nukleozydu obserwowano w przypadku inkubacji z wieprzową esterazą wątrobową (5×10^{-4} j/ml, **Ryc. 18**). W celu dokładniejszego zbadania procesu enzymatycznego uwalniania 2CdA z tych preparatów eksperyment z esterazą wątrobową powtórzono stosując 10-krotnie wyższe stężenie enzymu, wydłużając czas inkubacji do 72 godzin i badając skład mieszaniny reakcyjnej metodą gradientową HPLC. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono na **Ryc. 19** i **20**. Analiza HPLC wykazała, że w przypadku obu badanych preparatów estrowych, w miarę wydłużania czasu inkubacji stężenie wolnej 2CdA ulegało ciągłemu wzrostowi, a stężenie składników „długotańcuchowych” (związków IV, V, VI, VII; zob. **Ryc. 19** i **20**, **Tab. III**) w sposób ciągły malało aż do ich wyczerpania. Stężenie szeregu estrów o mniejszej liczbie merów kwasu (R,S)- β -hydroksymastłowego wykazywało przejściowy wzrost z następnym spadkiem. Obserwowano także pojawianie się pewnych niewykrywalnych wcześniej składników (AK1 – IIIa i IIIb, AK2 – IIIa). Było to najprawdopodobniej wynikiem wzrostu ich stężenia (absolutnego lub względem substancji o zbliżonym czasie retencji), pozwalającego na identyfikację tych związków jako indywidualnych składników mieszaniny przez algorytm analizujący chromatogram.

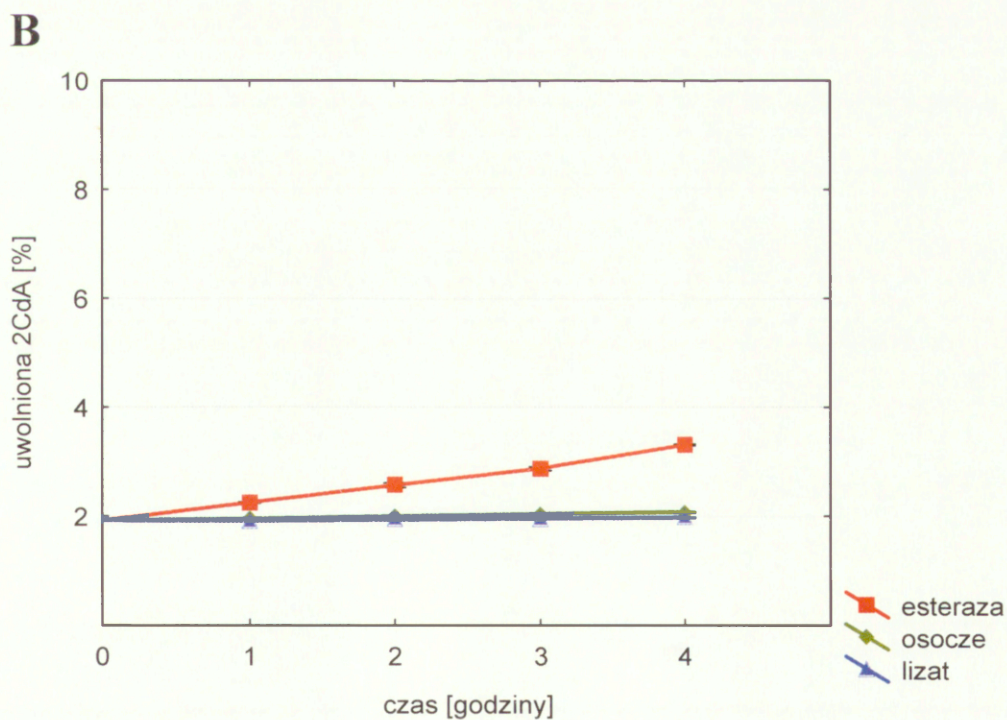
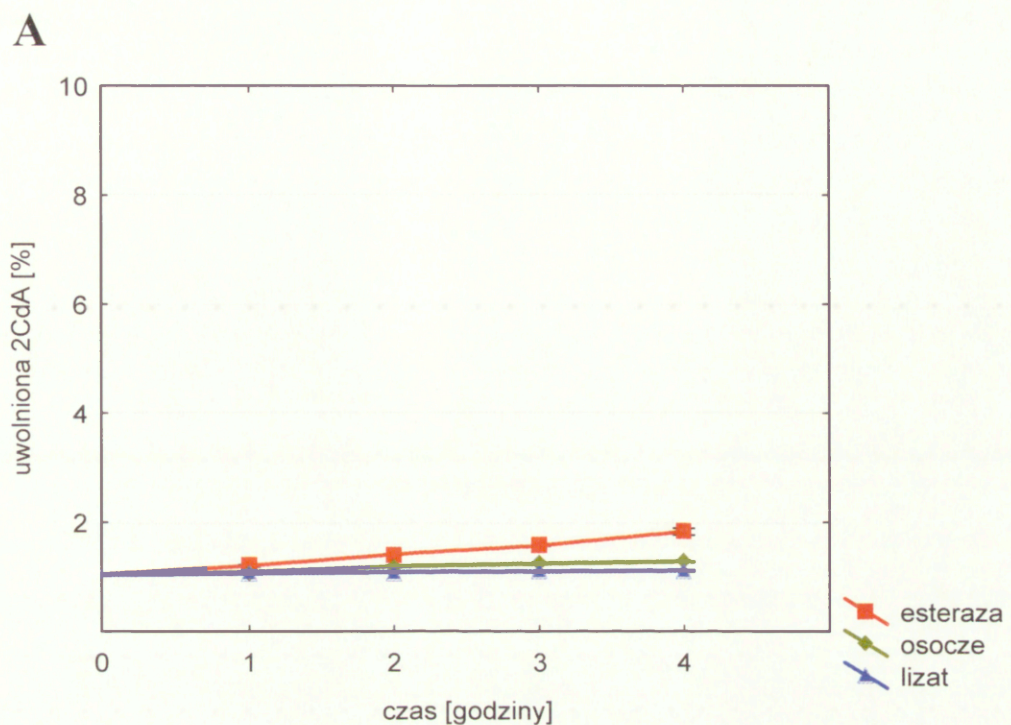
Tempo wzrostu stężenia niezestryfikowanej 2CdA w enzymatycznym hydrolizacie preparatu AK2 w 1 dobie hydrolizy, a szczególnie w ciągu pierwszych 12 godzin, przewyższało szybkość tego procesu w roztworze preparatu AK1. Jednak po 3 dobach hydrolizy preparatu AK1 stężenie wolnej 2CdA w roztworze odpowiadało niemal 99% całkowitej wyjściowej ilości 2CdA, natomiast w odpowiednim hydrolizacie preparatu AK2 niezestryfikowana 2CdA odpowiadała 90% wyjściowej zawartości, a pozostałe 10% przypadło na jeden z jej domniemanych 5'-O-estrów.



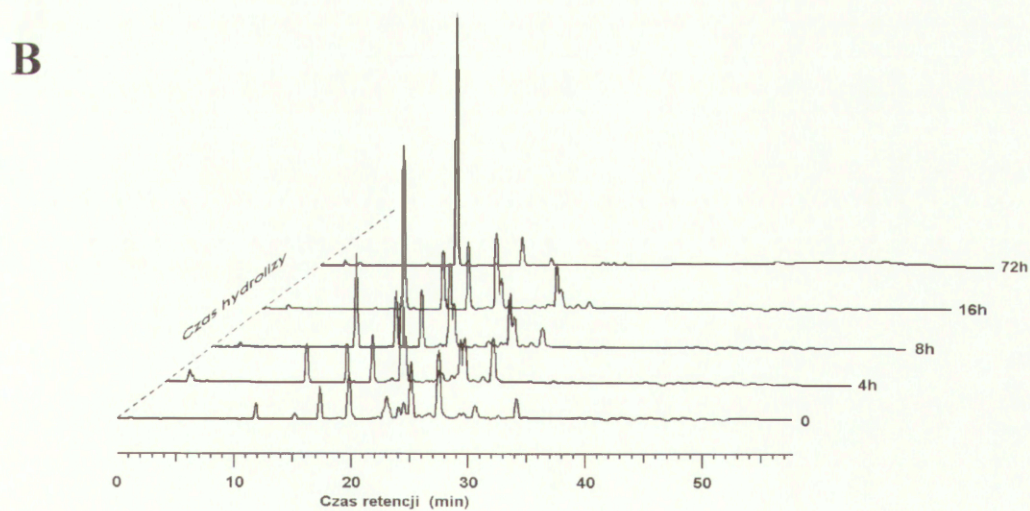
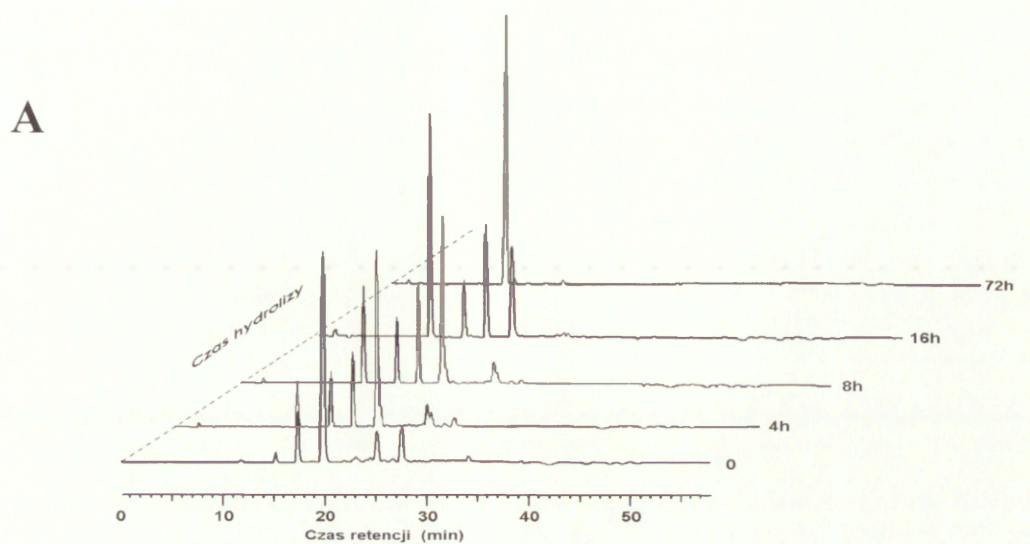
Ryc. 16. Kinetyka hydrolizy enzymatycznej 2CdA-LA (panel **A**) i dA-LA (panel **B**). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$) w procentach wyjściowej zawartości nukleozydu w estrze. * - osocze krwi użyte w doświadczeniach było rozcieńczone $1000 \times 0,1$ M buforem fosforanowym o pH 7,4.



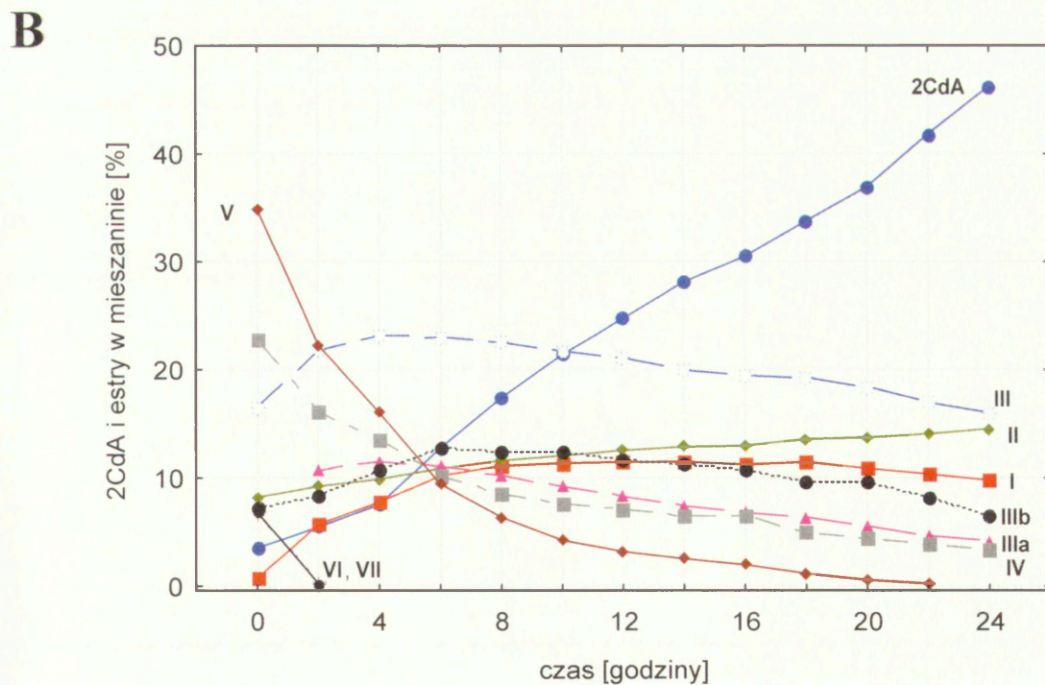
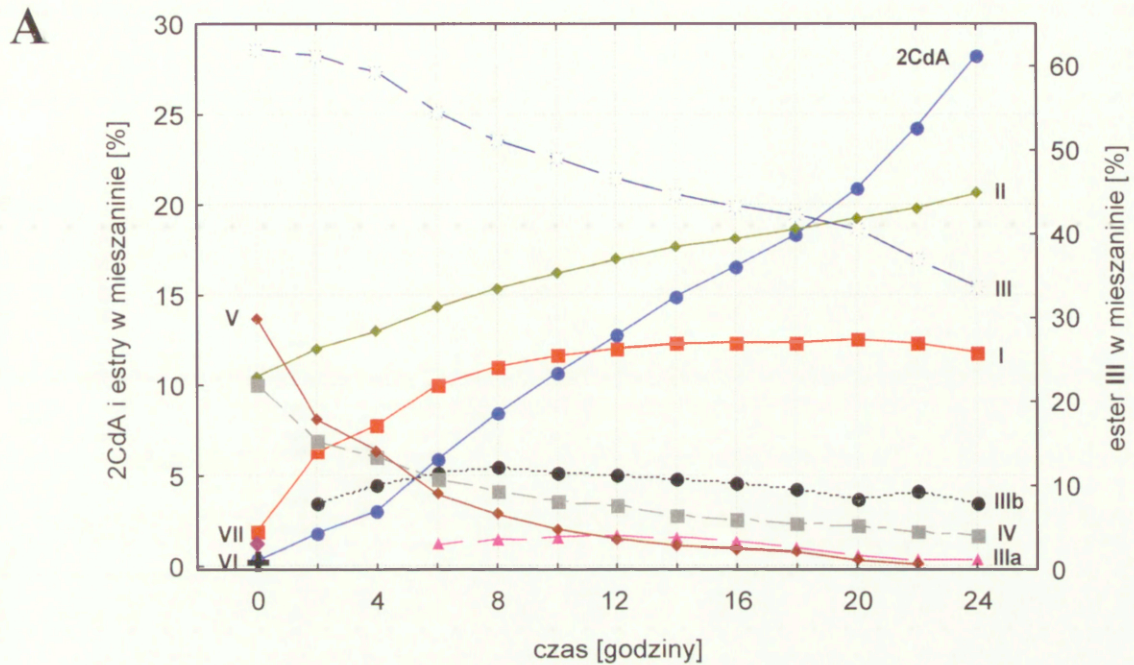
Ryc. 17. Kinetyka hydrolizy enzymatycznej 2CdA-CLB (panel A) i dA-CLB (panel B). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$) w procentach wyjściowej zawartości nukleozydu w estrze.



Ryc. 18. Kinetyka hydrolizy enzymatycznej 5'-O-estrów kladrybiny z kwasem poli(R,S- β -hydroksymaleowym) AK1 (panel **A**) i AK2 (panel **B**). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4) w procentach wyjściowej zawartości nukleozydu w preparacie.



Ryc. 19. Kinetyka zmian składu roztworów preparatów estrowych AK1 (panel **A**) i AK2 (panel **B**) inkubowanych z wieprzową esterazą wątrobową (stężenie esteraży: 5×10^{-3} j/ml).



Ryc. 20. Kinetyka zmian składu preparatów estrowych AK1 (panel **A**) i AK2 (panel **B**), inkubowanych z wieprzową esterazą wątrobową (stężenie esterazy: 5×10^3 j/ml), w ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji. Krzywe przedstawiające estry VI i VII na wykresie **B** pokrywają się.

Tabela III. Kinetyka zmian zawartości niezestryfikowanej 2CdA i estrów 2CdA z PHB w roztworach preparatów poddanych działaniu wieprzowej esterazy wątrobowej.

Preparat	Czas hydrolizy [godz.]	Względny udział składnika w ogólnej zawartości 2CdA w hydrolizowanej mieszaninie (%)									
		2CdA (11,9)**	I (15,3)	II (17,4)	III (19,9)	IIIa (20,5)	IIIb (23,8)	IV (25,2)	V (27,6)	VI (30,6)	VII (34,2)
AK1	0	0,9	1,9	10,5	62,0	-	-	10,0	13,3	0,2	1,2
	2	1,8	6,6	12,1	61,3	-	3,4	7,0	8,1	-	-
	4	3,1	7,8	13,0	59,3	-	4,4	6,0	6,4	-	-
	6	5,9	10,0	14,3	54,6	1,2	5,2	4,8	4,0	-	-
	8	8,5	11,1	15,4	51,2	1,5	5,4	4,1	2,9	-	-
	12	12,8	12,0	17,0	46,6	1,7	5,1	3,3	1,5	-	-
	16	16,6	12,4	18,1	43,3	1,4	4,6	2,6	1,0	-	-
	20	20,8	12,6	19,3	40,6	0,5	3,7	2,2	0,3	-	-
	24	28,2	11,8	20,6	33,8	0,3	3,5	1,7	-	-	-
	72	98,9	0,1	0,9	-	-	-	-	-	-	-
AK2	0	1,9	0,7	7,2	15,3	-	6,6	21,7	33,5	6,5	6,6
	2	5,5	5,7	9,2	21,8	10,6	8,3	16,1	22,2	0,3	0,2
	4	7,5	7,8	9,9	23,1	11,5	10,7	13,6	16,0	-	-
	6	12,7	10,2	10,8	23,0	11,0	12,7	10,1	9,4	-	-
	8	17,4	11,1	11,6	22,5	10,2	12,4	8,4	6,3	-	-
	12	24,7	11,5	12,5	21,1	8,3	11,7	7,1	3,2	-	-
	16	30,5	11,2	13,0	19,5	6,8	10,7	6,4	1,9	-	-
	20	36,9	10,9	13,7	18,3	5,6	9,6	4,4	0,5	-	-
	24	46,2	9,7	14,5	15,9	4,0	6,5	3,3	-	-	-
	72	90,0	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-

** - identyfikator składnika (czas retencji, min.)

4.3. Wychwyty [8-¹⁴C]2CdA przez komórki nienowotworowe i nowotworowe

Kinetykę wychwyty znakowanej izotopowo kładrybiny przez KJKO oraz komórki ostrej białaczki promielocytowej HL60 przedstawiono na **Ryc. 21**. Zarówno komórki normalne, jak i nowotworowe akumulowały radioaktywność intensywnie przez ok. 45 minut, przy czym akumulacja przez komórki HL60 była ok. 4-krotnie szybsza. W ciągu następnych 15 minut szybkość akumulacji ¹⁴C przez oba typy komórek wykazywała ciągły spadek, a od 60. min. inkubacji ilość zakumulowanej radioaktywności ¹⁴C wykazywała w obu typach komórek taki sam, nikły, praktycznie liniowy przyrost.

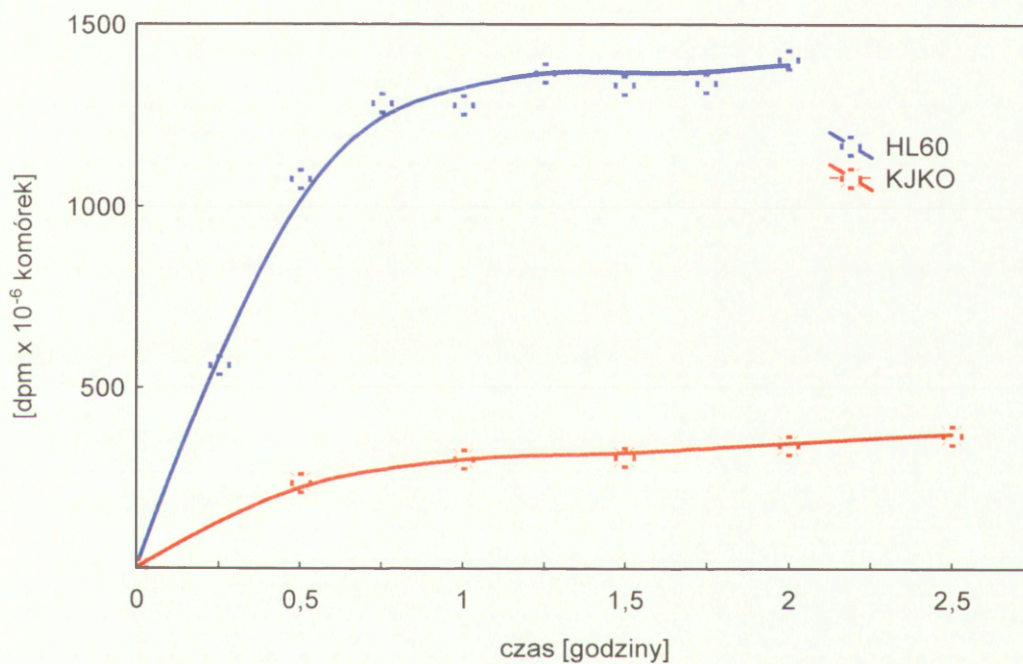
4.4. Wychwyty [8-¹⁴C]dA przez komórki HL60 i MOLT4 preinkubowane z dA-CLB lub związkami macierzystymi estru

Wychwyty radioizotopu przez komórki w próbkach kontrolnych (wyrażony w procentach całkowitej ilości [8-¹⁴C]dA dodanej do zawiesiny komórek) był dla linii HL60 znacznie niższy ($3,9\% \pm 0,39\%$, średnia \pm SD, $n=4$), niż dla linii MOLT4 ($9,61\% \pm 0,66\%$, $n=4$). Preinkubacja komórek MOLT4 z 5'-O-estrem 2'-deoksyadenozyny z CLB istotnie zmniejszała wychwyty radionukleozydu, natomiast w komórkach linii HL60 efekt ten nie osiągał wartości statystycznie istotnej. Preinkubacja z substancjami macierzystymi tego estru nie wykazała istotnego wpływu na wychwyty [8-¹⁴C]dA w żadnej z tych linii komórkowych (**Ryc. 22**).

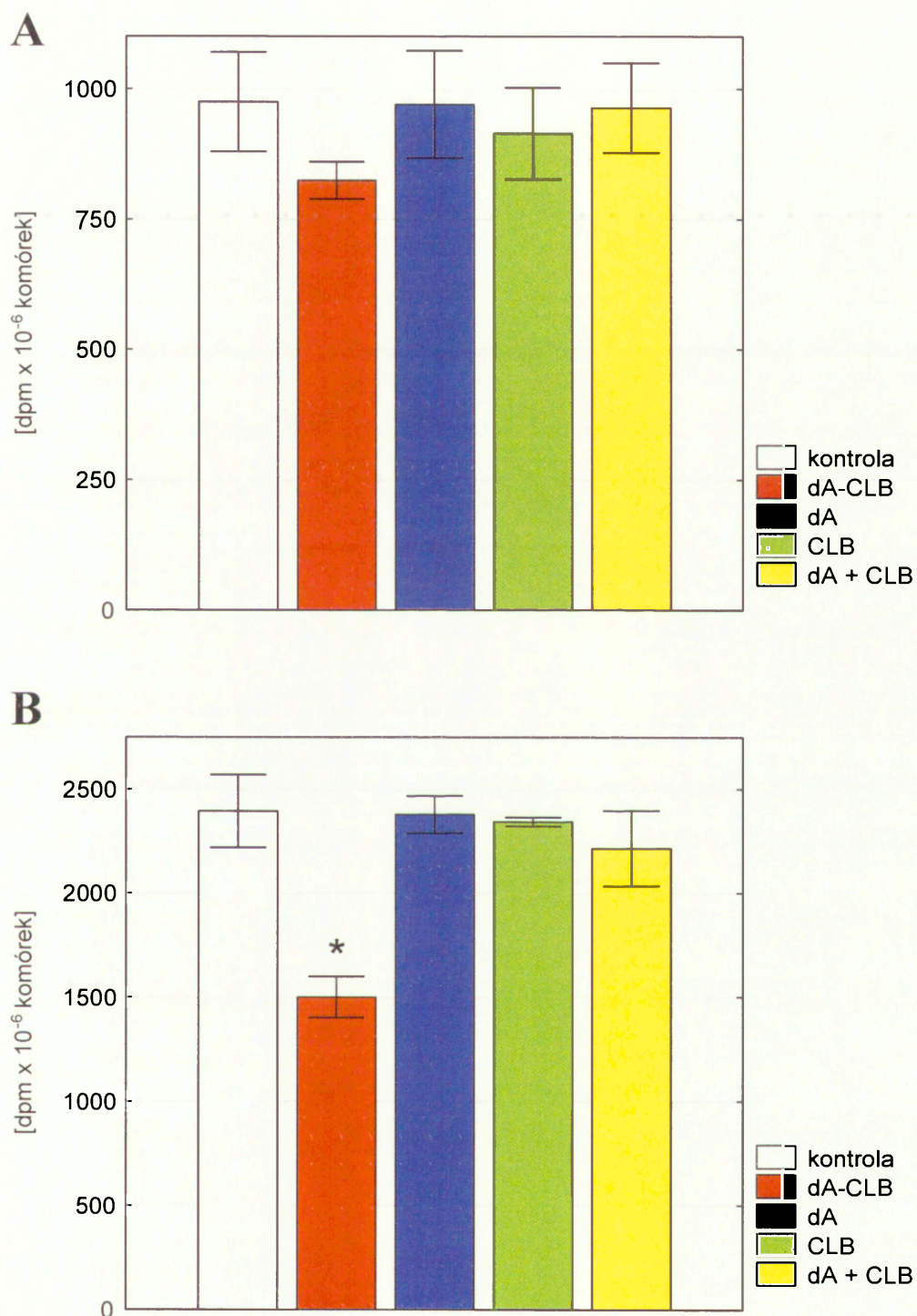
4.5. Wychwyty [8-¹⁴C]nukleozydu przez komórki HL60, MOLT4 i KJKO inkubowane z mieszaninami radionukleozydu i substancji badanej

Rezultaty eksperymentów, w których komórki inkubowano ze znakowanym nukleozydem w nieobecności i w obecności 5-krotnego (molowo) nadmiaru jego nieradioaktywnego odpowiednika lub 5'-O-estru z CLB jako kompetytora przedstawiono na **Ryc. 23**. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ typu komórek ($F_{2,18}=348,5$, $p<10^{-6}$, panel **A** i $F_{2,18}=335,5$, $p<10^{-6}$, panel **B**) oraz rodzaju kompetytora ($F_{2,18}=748,8$, $p<10^{-6}$, panel **A** i $F_{2,18}=853,3$, $p<10^{-6}$, panel **B**) na wychwyty radionukleozydu, a także istotny efekt interakcji między tymi czynnikami ($F_{4,18}=240,0$, $p<10^{-6}$, panel **A** i $F_{4,18}=261,1$, $p<10^{-6}$, panel **B**). Komórki MOLT4 wychwytywały badane nukleozydy znacznie silniej, niż komórki HL60, a wychwyty [8-¹⁴C]dA i [8-¹⁴C]2CdA przez KJKO był wielokrotnie słabszy, niż przez którąkolwiek z tych linii nowotworowych. Oba badane 5'-O-estry i ich nukleozydy macierzyste hamowały wychwyty radionukleozydów przez wszystkie te komórki. Wychwyty [8-¹⁴C]dA i [8-¹⁴C]2CdA przez komórki HL60 i KJKO był hamowany w podobnym stopniu przez odpowiedni nieradioaktywny nukleozyd i jego ester (**Ryc. 23**, panel **A**). W przypadku komórek MOLT4 wychwyty [8-¹⁴C]dA był hamowany istotnie silniej przez dA-CLB, niż przez niezestryfikowany

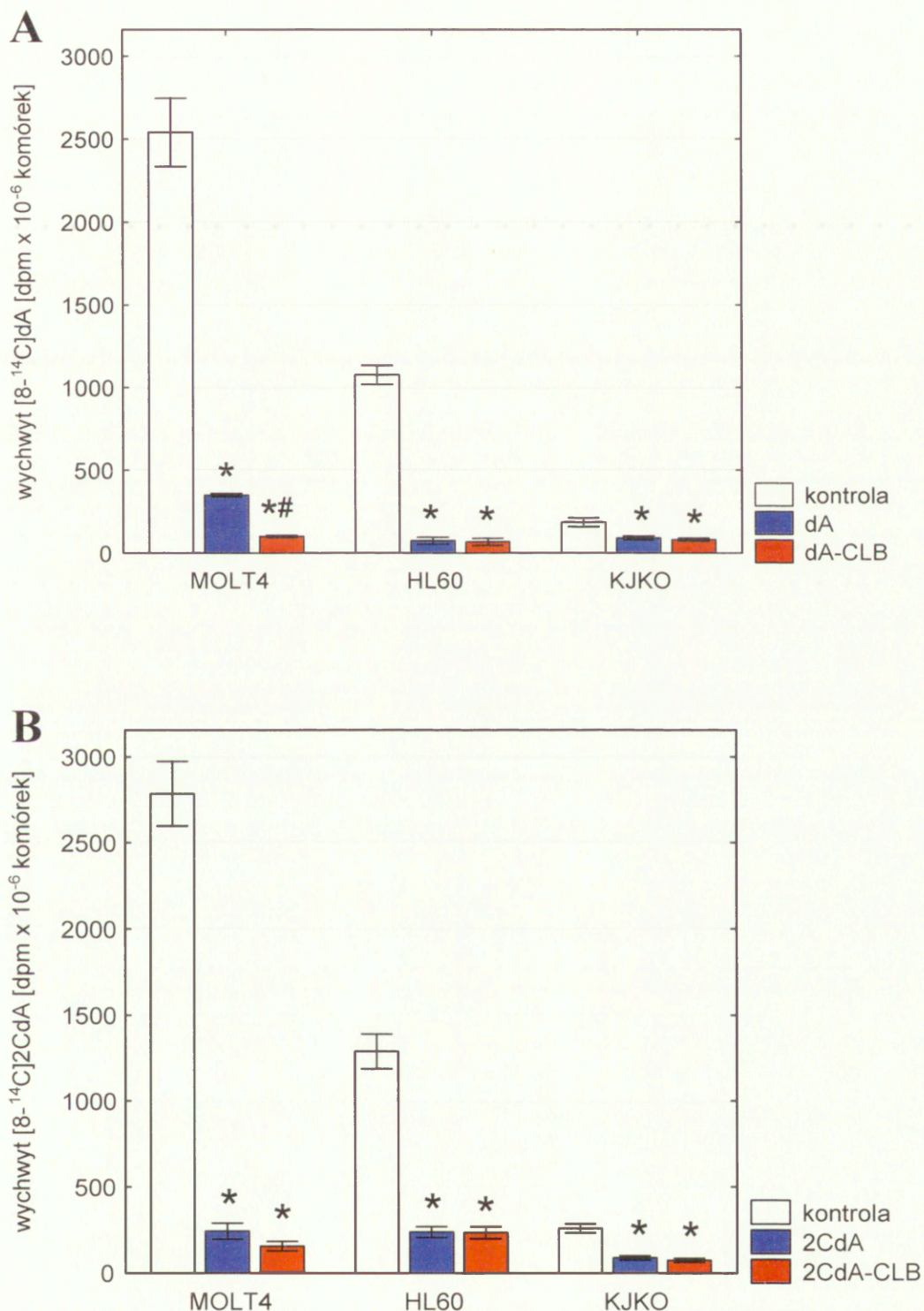
macierzysty nukleozyd; podobną tendencję ($p = 0,0504$) zaobserwowano także w przypadku wychwytu $[8-^{14}\text{C}]2\text{CdA}$ (Ryc. 23, panel B).



Ryc. 21. Wychwyt $[8-^{14}\text{C}]2\text{CdA}$ przez komórki HL60 i KJKO.



Ryc. 22. Wychwył $[8-^{14}\text{C}]dA$ przez komórki HL60 (panel A; ANOVA: $F_{4,10}=1,7$, $p = 0,23$) i MOLT4 (panel B; ANOVA: $F_{4,10}= 26,2$, $p = 2,8 \times 10^{-3}$). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$). * - wartość różniąca się w sposób znamiennej statystycznie ($p < 0,01$; test Dunnetta) od wartości kontrolnej.



Ryc. 23. Wpływ chlorambucylowych 5'-O-estrów 2'-deoksyadenozyny (panel **A**) i kladrybiny (panel **B**) na wychwył macierzystego nukleozydu przez komórki normalne i białaczkowe. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, n=4. * - p<0,01 wobec wartości kontrolnej, # - p<0,05 wobec odp. wartości dla komórek inkubowanych z nadmiarem odp. nieradioaktywnego macierzystego nukleozydu (test Studenta-Neumana-Keulsa).

4.6. Toksyczność 5'-O-estrów i związków macierzystych wobec komórek linii nowotworowych, wywodzących się z szeregu białokrwinkowego

Do wstępnych badań cytotoksyczności użyto komórek MOLT4. Wyniki badania przeżywalności tych komórek hodowanych przez 48 lub 96 godzin w obecności badanych 5'-O-estrów nukleozydowych lub ich związków macierzystych obrazują **Ryc. 24-28**. Stwierdzono, że:

24-28. Stwierdzono, że:

- 1° w stężeniu 5 nM żadna z badanych substancji lub ich kombinacji nie wywierała istotnego wpływu na przeżywalność komórek.
- 2° Ekspozycja na ≥ 50 nM stężenie 2CdA lub jej 5'-O-estru z CLB lub LA powodowała zmniejszenie przeżywalności komórek. Efekt ten był z reguły niewiele silniejszy po dłuższej ekspozycji (**Ryc. 24 i 25**).
- 3° Obecność w medium 500 nM 2CdA-CLB, 2CdA-LA, lub niezestryfikowanej 2CdA wywoływała, zarówno po 48, jak i 96 godz. hodowli spadek przeżywalności komórek przekraczający, z reguły, 90%. Efekt ten był wyraźnie słabszy jedynie w przypadku komórek inkubowanych z 2CdA-CLB przez 48 godzin (por. **Ryc. 24 i 25**).
- 4° Niezestryfikowany CLB, a także dA-CLB, w stężeniu do 500 nM, niezależnie od czasu trwania ekspozycji na te związki, nie wywierały mierzalnego wpływu na przeżywalność komórek. Przy podwyższeniu stężenia do 5 μ M dA-CLB obniżał przeżywalność o ponad 90%, ale dla niezestryfikowanego CLB efekt ten był znacznie słabszy (**Ryc. 26**).
- 5° Niezestryfikowane LA i dA, a także dA-LA nie obniżały przeżywalności komórek w badanym zakresie stężeń (**Ryc. 27**).
- 6° Preparaty estrowe AK1 i AK2 nieznacznie obniżały przeżywalność komórek MOLT4 dopiero w stężeniu 500 nM i przy 96-godzinnej ekspozycji (**Ryc. 28**). Przy 5 μ M stężeniu w medium hodowlanym wpływ tych preparatów, a zwłaszcza AK1 na przeżywalność komórek po 48-godzinnej ekspozycji również był znacznie słabszy niż pozostałych badanych estrów 2CdA (por. **Ryc. 28**, panel **A**; **Ryc. 24**, panel **A** i **Ryc. 25** panel **A**). Różnica ta zniknęła jednak po wydłużeniu ekspozycji do 96 godzin.

Wyniki powyższych eksperymentów wykazały, że jedynie 5'-O-ester dA z CLB jest bardziej aktywny przeciwnowotworowo od macierzystego cytostatyku, tj. CLB. Postanowiono zatem bliżej określić jego cytotoksyczność wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych, wywodzących się z różnych komórek szeregu białokrwinkowego, przez ustalenie odpowiednich wartości IC_{50} . Na podstawie wyników wcześniejszych doświadczeń nowe eksperymenty przeprowadzono dla nieco innych

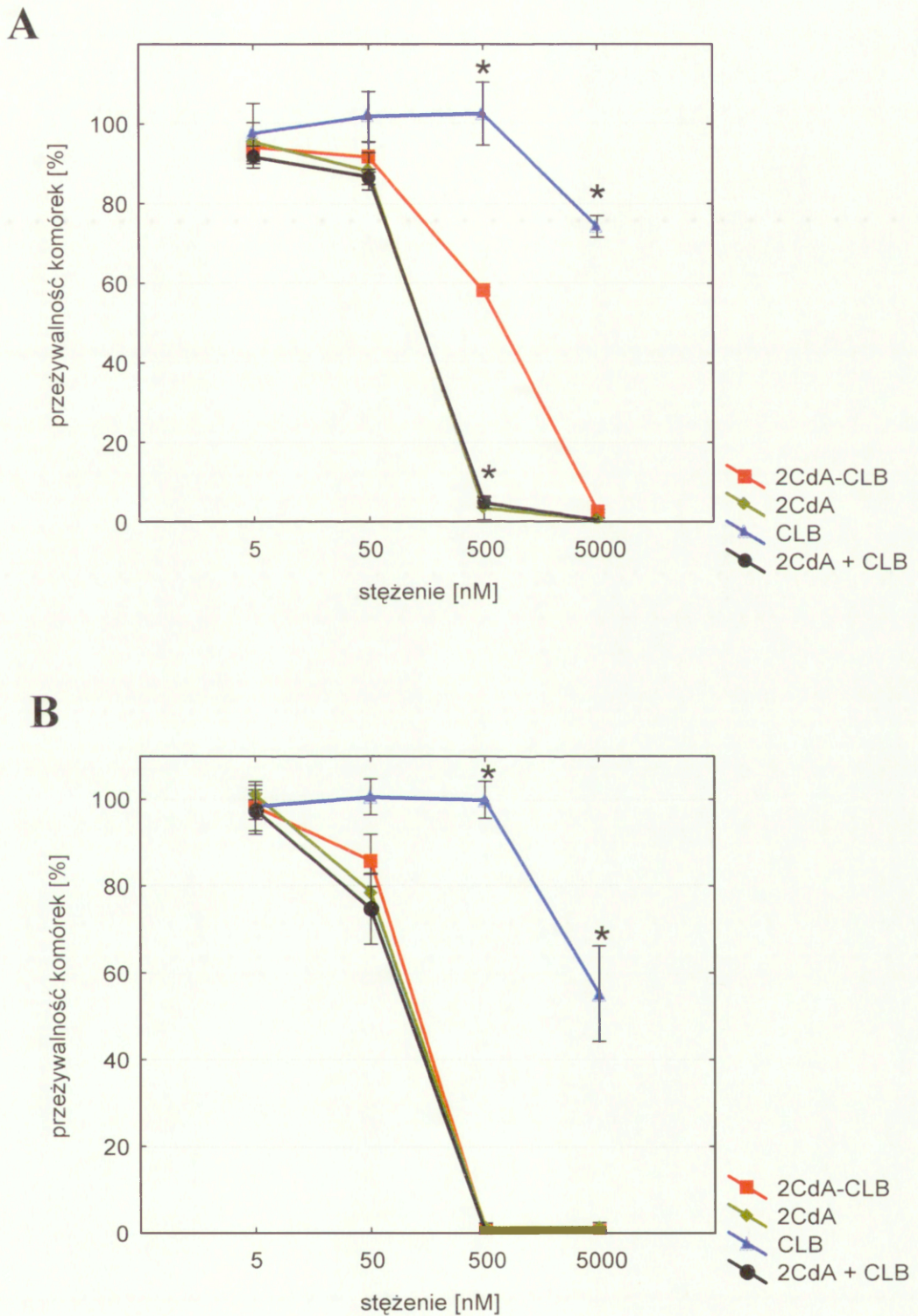
zakresów stężeń badanych substancji: 0,25-20 μM – dla dA-CLB i 0,5-40 μM – dla CLB. Wyniki tych badań przedstawiono na **Ryc. 29-31**.

Ester dA-CLB okazał się bardziej cytotoksyczny od niezestryfikowanego CLB wobec wszystkich przebadanych linii komórkowych, przy czym najbardziej wrażliwe na działanie obu tych związków były komórki linii MOLT4, a najmniej – linii K562. Dla komórek HL60 IC_{50} dA-CLB było ok. dwukrotnie mniejsze od IC_{50} niezestryfikowanego CLB dla hodowli 48-godzinnej i ok. 6-ciokrotnie mniejsze – dla 96-godzinnej. Podobne zależności uzyskano w doświadczeniach na komórkach MOLT4. Komórki K562 inkubowano z tymi związkami jedynie przez 96 godzin; uzyskana wartość IC_{50} dA-CLB dla tych komórek była ponad 2,5-krotnie niższa od odpowiedniej wartości dla CLB (**Tab. IV**).

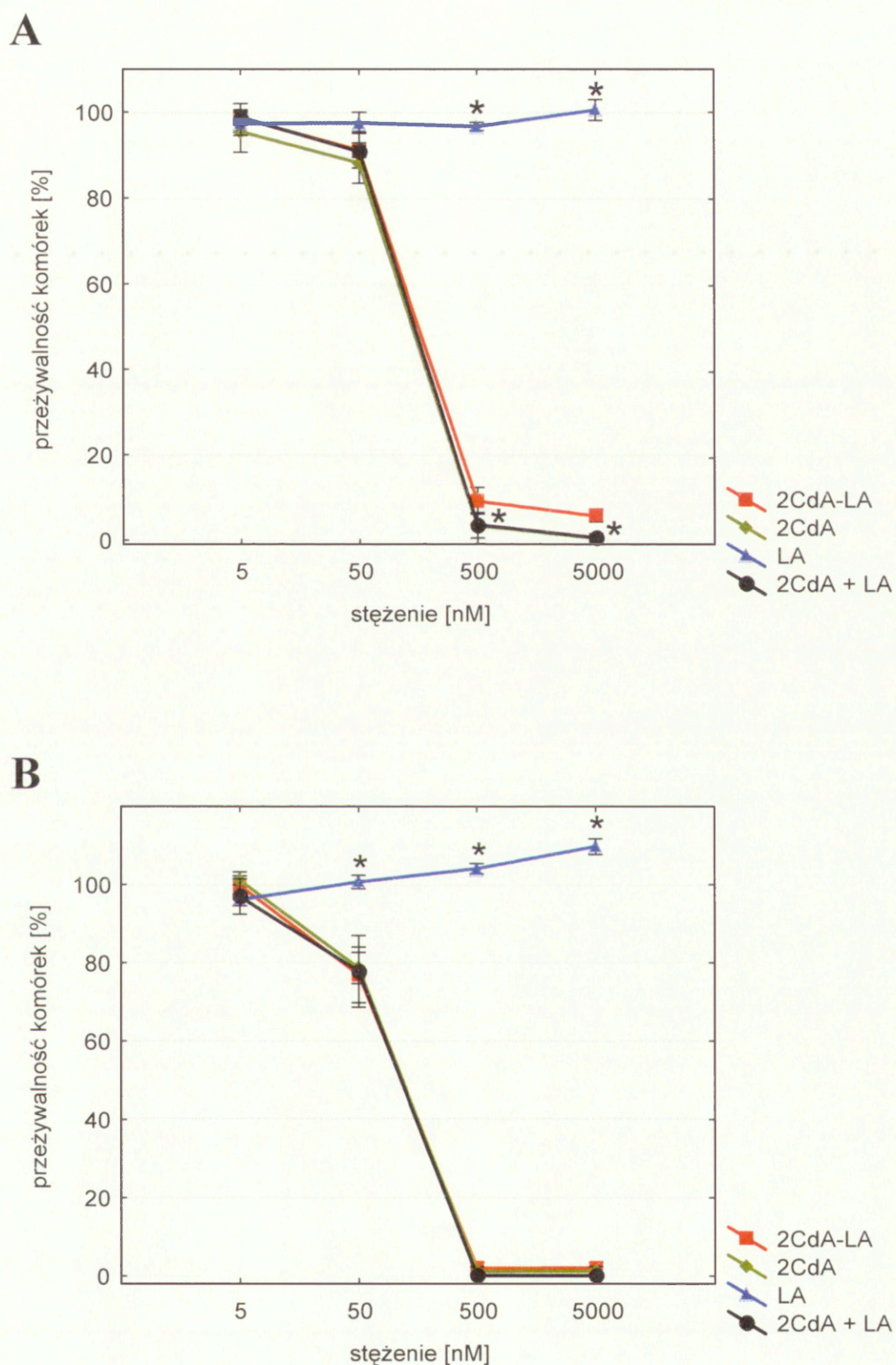
Tabela IV. Wartości IC_{50} dla CLB i dA-CLB wyznaczone na podstawie doświadczeń na hodowlach komórkowych.

Linia komórkowa	Czas ekspozycji	Związek badany	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [μM]
HL 60	48 godzin	dA-CLB	$5,33 \pm 1,61^*$
		CLB	$11,38 \pm 3,08$
	96 godzin	dA-CLB	$1,04 \pm 0,15^*$
		CLB	$6,31 \pm 0,94$
MOLT 4	48 godzin	dA-CLB	$1,63 \pm 0,13^*$
		CLB	$4,36 \pm 0,41$
	96 godzin	dA-CLB	$0,95 \pm 0,24^*$
		CLB	$4,40 \pm 0,70$
K562	96 godzin	dA-CLB	$4,53 \pm 0,70^*$
		CLB	$12,39 \pm 2,46$

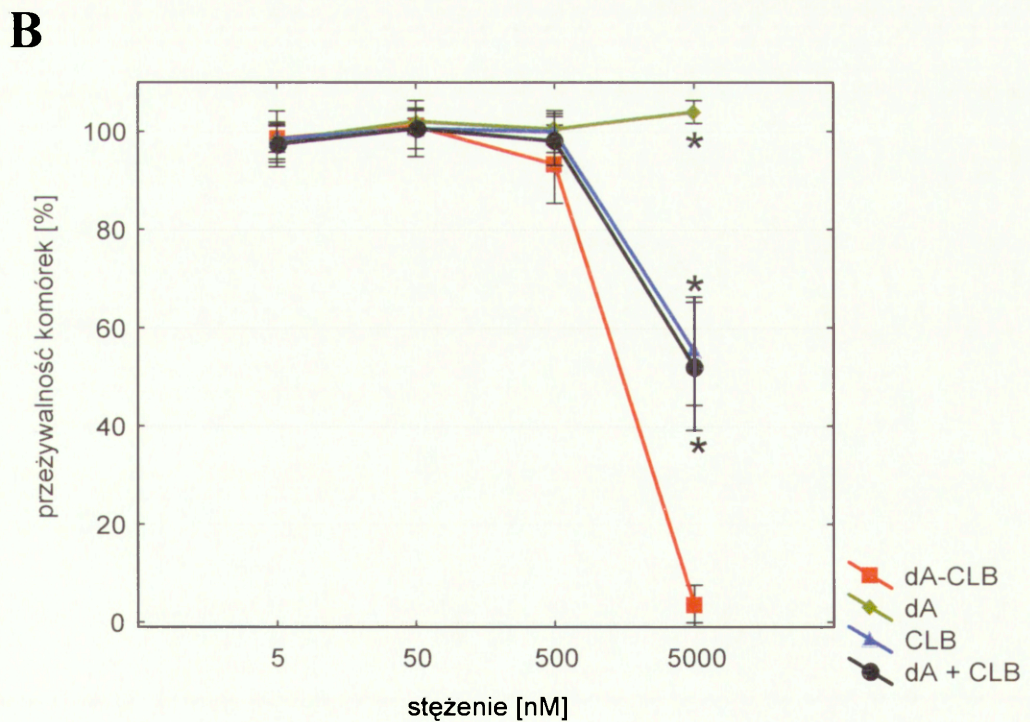
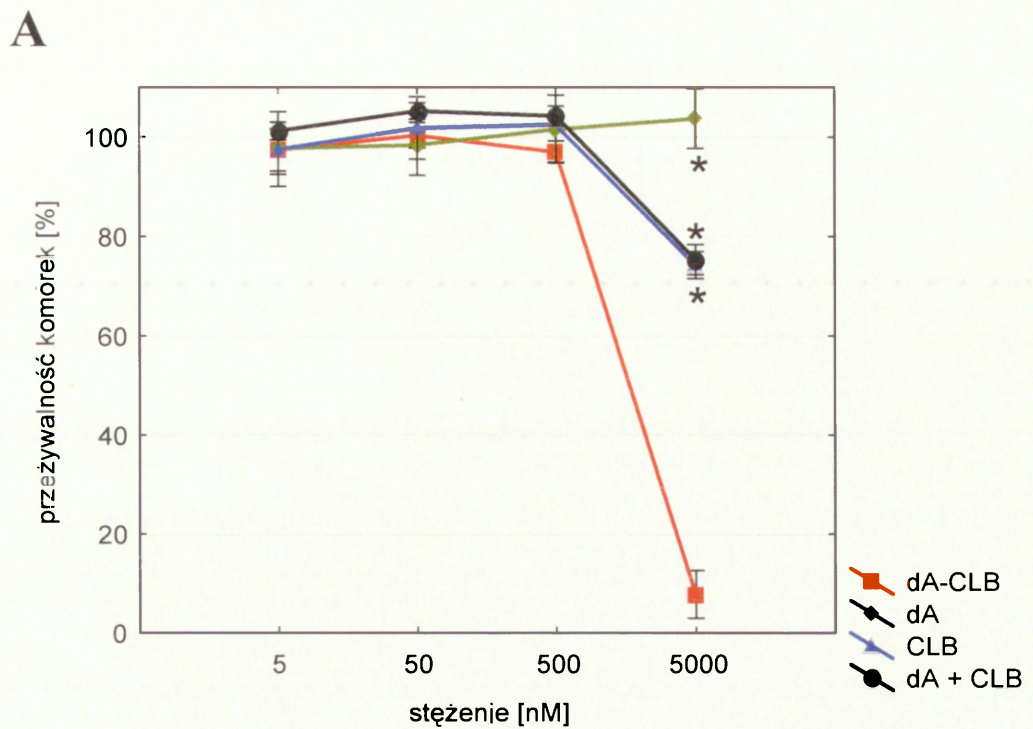
HL60 – ostra białaczka promielocytowa, MOLT4 – ostra białaczka T-komórkowa limfoblastyczna, K562 – przewlekła białaczka szpikowa, IC_{50} – stężenie hamujące wzrost hodowli komórkowej o 50%. * - $p < 0,01$ w porównaniu z odpowiednią wartością dla komórek inkubowanych z niezestryfikowanym CLB (test *t*-Studenta).



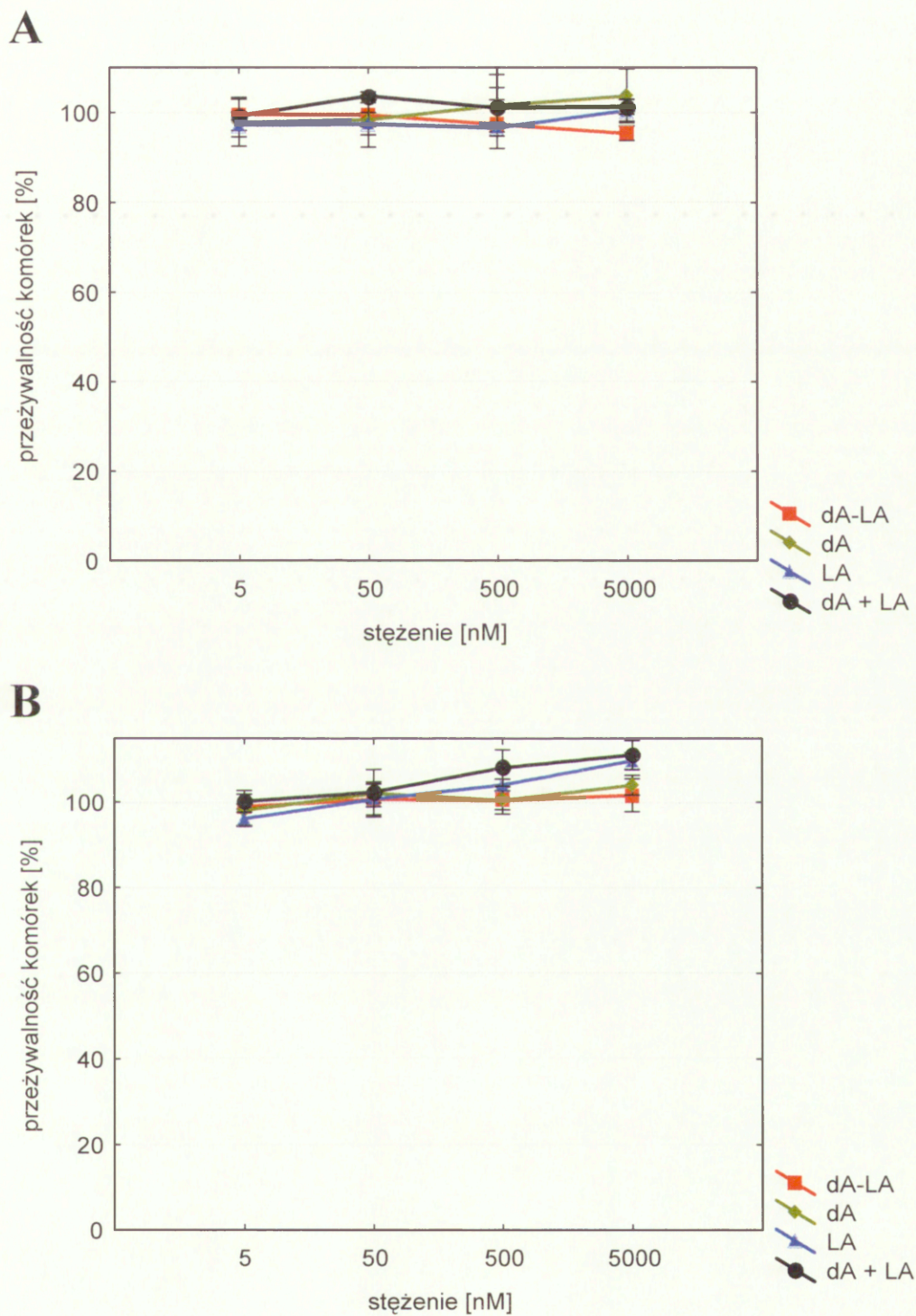
Ryc. 24. Przeżywalność komórek MOLT4 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z 2CdA-CLB, 2CdA, CLB lub równomolarną mieszaniną 2CdA i CLB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$). * - wartości różniące się w sposób znamieny statystycznie ($p < 0,01$, test Dunnetta) od odpowiednich wartości dla 2CdA-CLB.



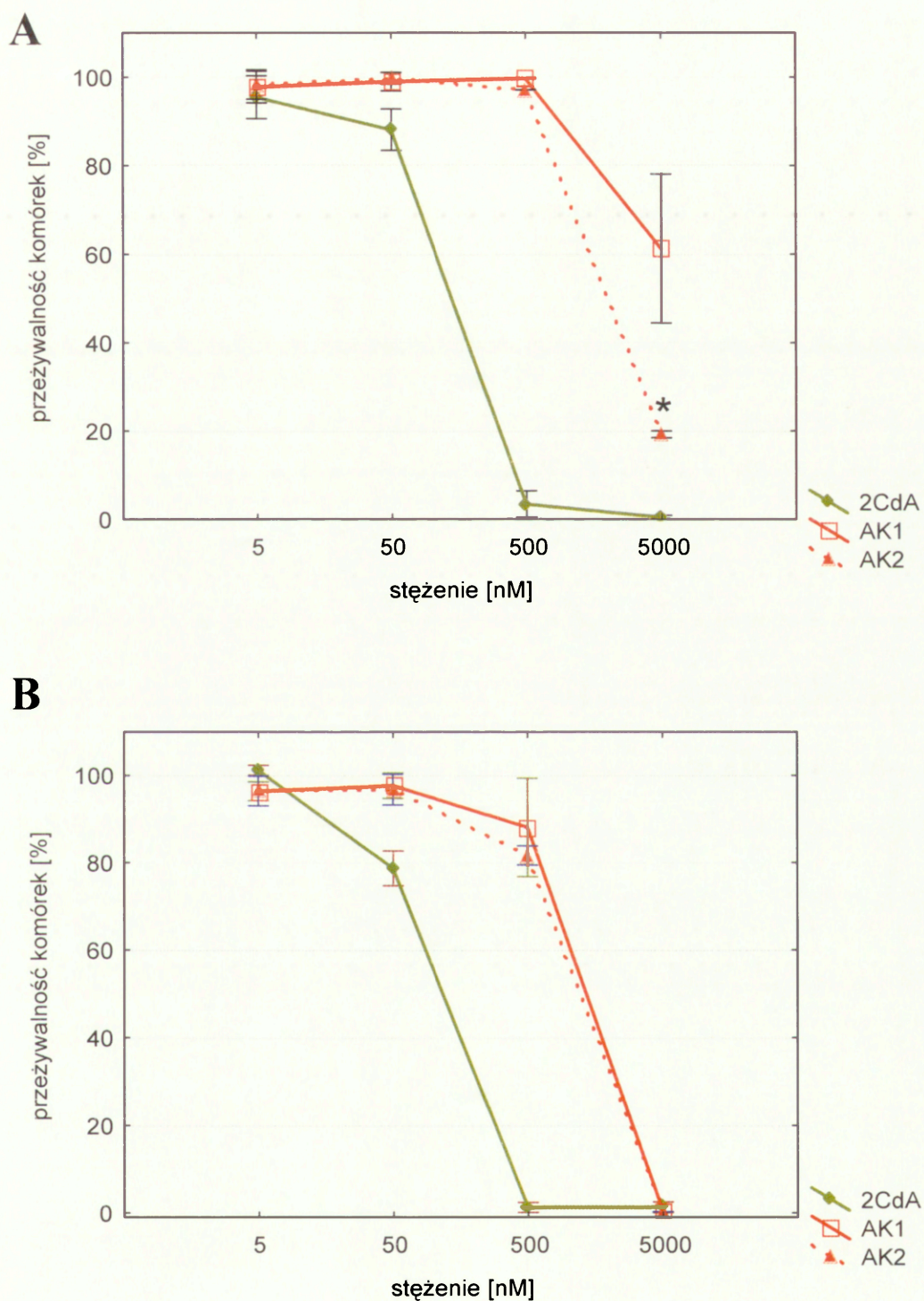
Ryc. 25. Przeżywalność komórek MOLT4 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z 2CdA-LA, 2CdA, LA lub równomolarną mieszaniną 2CdA i LA. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$). * - wartości różniące się w sposób znamieny statystycznie ($p < 0,01$, test Dunnetta) od odpowiednich wartości dla 2CdA-LA



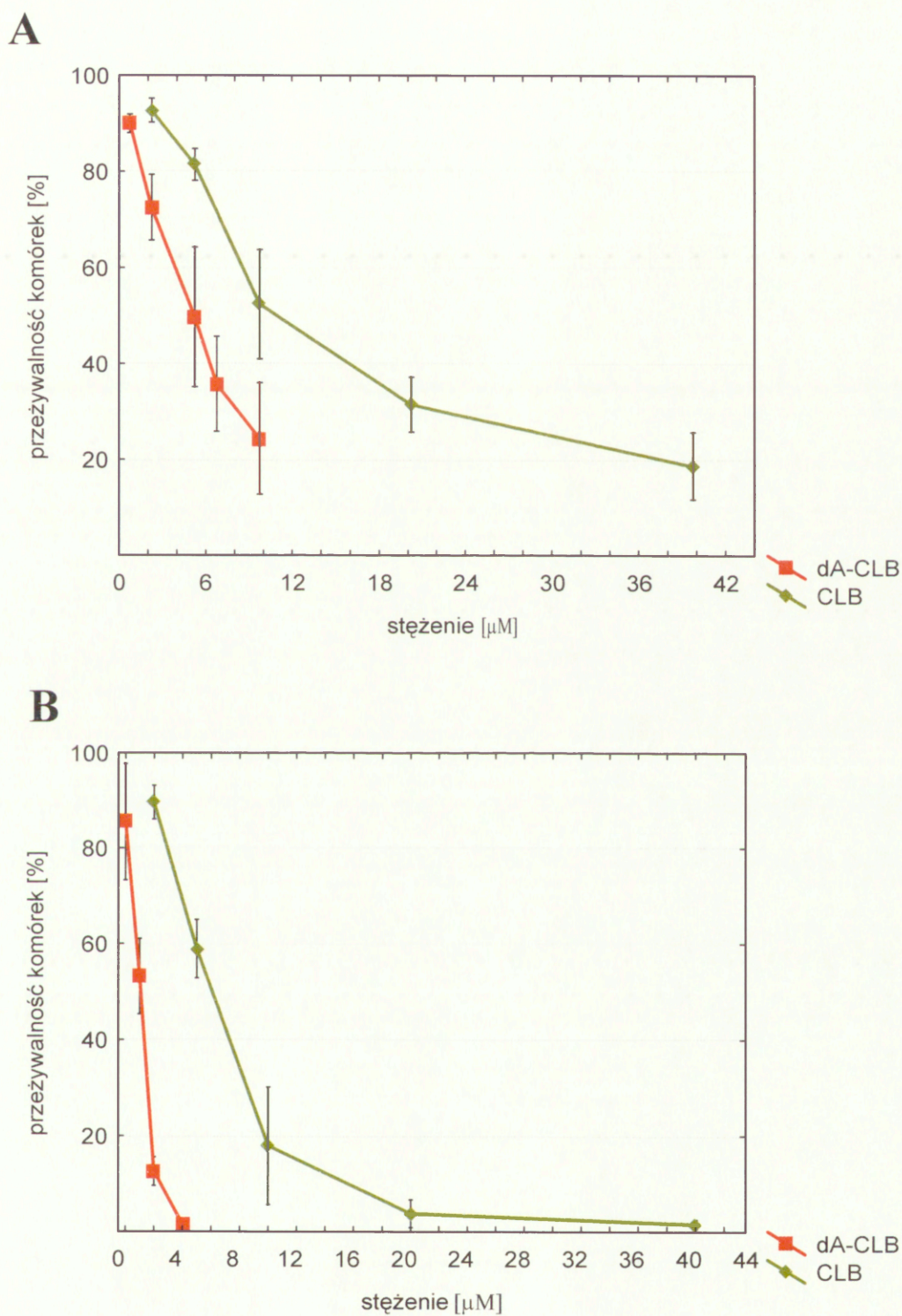
Ryc. 26. Przeżywalność komórek MOLT4 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z dA-CLB, dA, CLB lub równomolarną mieszaniną dA i CLB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$). * - wartości różniące się w sposób znamieny statystycznie ($p < 0,01$, test Dunnetta) od odpowiednich wartości dla dA-CLB.



Ryc. 27. Przeżywalność komórek MOLT4 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z dA-LA, dA, LA lub równomolarną mieszaniną dA i LA. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$).

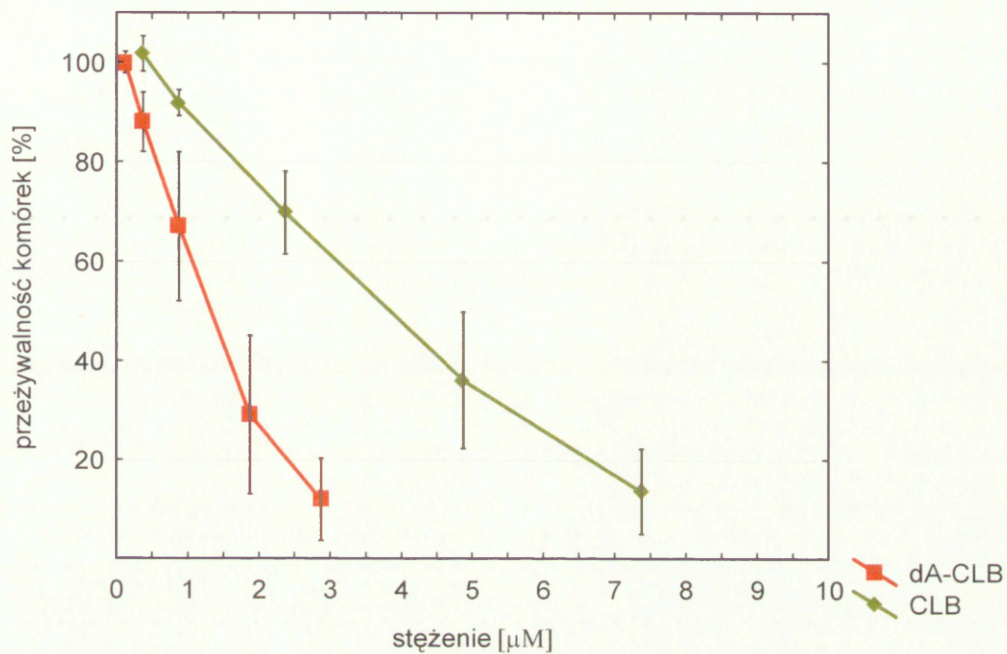


Ryc. 28. Przeżywalność komórek MOLT4 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z 2CdA oraz preparatami estrowymi kładrybiny z PHB (AK1, AK2). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD ($n=4$). * - wartość różniąca się w sposób znamieny statystycznie ($p < 0,01$, test Dunnetta) od odpowiedniej wartości dla AK1.

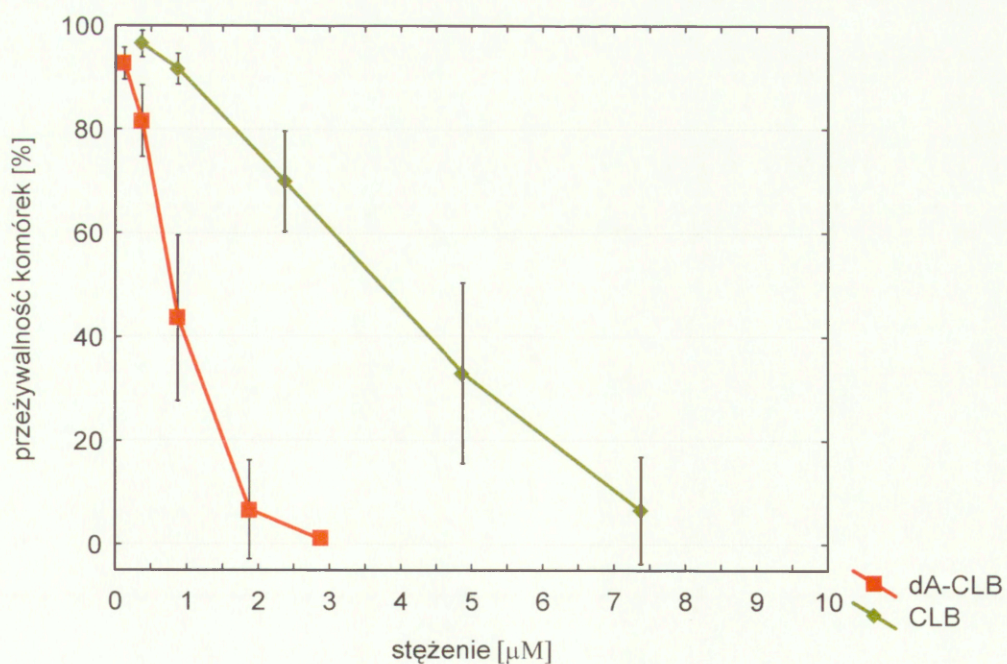


Ryc. 29. Przeżywalność komórek HL60 eksponowanych przez 48 (panel **A**) lub 96 godzin (panel **B**) z CLB lub dA-CLB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4).

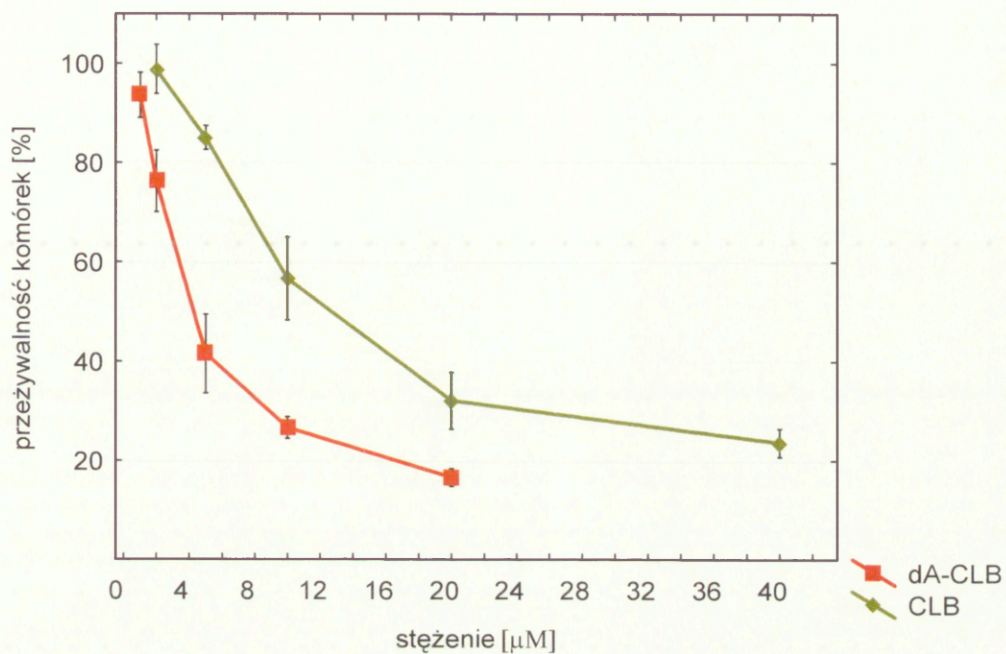
A



B



Ryc. 30. Przeżywalność komórek MOLT4 ekspozycyjnych przez 48 (panel A) lub 96 godzin (panel B) z CLB lub dA-CLB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4).



Ryc. 31. Przeżywalność komórek K562 eksponowanych przez 96 godzin z CLB lub dA-CLB. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4).

5. DYSKUSJA

Przedmiotem niniejszej rozprawy jest ocena wybranych właściwości kilku nowych estrowych pochodnych nukleozydów purynowych, 2'-deoksyadenozyny (dA) i jej cytotoksycznej pochodnej 2-chloro-2'-deoksyadenozyny (2CdA), pod kątem celowości dalszego ich rozwijania jako leków przeciwbiałaczkowych i przeciwnowotworowych. Badaniami objęto estry dA i 2CdA z niskocząsteczkowymi kwasami organicznymi (kwasem α -liponowym – LA, oraz chlorambucylem – CLB), oraz preparaty zawierające estry 2CdA z kwasem organicznym o charakterze polimeru (kwas poli(R,S- β -hydroksymasłowy) – PHB). Wszystkie badane estry odpowiadają definicji proleku przytoczonej we wstępie (zob. rozdz. 1.2, str. 15). Podkreślić jednak należy, że niskocząsteczkowe kwasy organiczne LA i CLB mają zasadniczo odmienne właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne niż PHB. Mianowicie wg danych literaturowych zarówno CLB, jak LA wykazują (choć ten drugi dopiero w stosunkowo wysokich, milimolarnych stężeniach) właściwości cytotoksyczne. Natomiast ani PHB, ani końcowy produkt jego hydrolizy, kwas β -hydroksymasłowy (R lub S), nie są cytotoksyczne. Przeciwnie, w układach doświadczalnych będących modelami pewnych schorzeń neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera) kwas β -hydroksymasłowy wykazywał właściwości cytoprotekcyjne [96; 171]. Jest więc oczywiste, że synteza estrów dA i 2CdA z LA i CLB miała odmienne przesłanki, niż synteza estrowych koniugatów 2CdA z PHB. W związku z tym wyniki dotyczące estrów z CLB i LA oraz estrów z PHB są dyskutowane oddzielnie.

5.1. Estry dA i 2CdA z niskocząsteczkowymi, cytotoksycznymi kwasami organicznymi

Przesłanką dla syntezy estrów złożonych z nukleozydów purynowych i niskocząsteczkowych cytotoksycznych kwasów karboksylowych była hipoteza robocza dotycząca ich przypuszczalnych przemian w komórkach docelowych, tj. komórkach wykazujących wysoką aktywność enzymów kinazy deoksycytydynamowej (dCK) i/lub dezaminazy adenozydowej (ADA). Koncepcja ta jest przedstawiona na **Ryc. 8** (str. 20). Zakłada ona, że estry te wewnątrz komórek ulegają enzymatycznej hydrolizie katalizowanej przez esterazy, a następnie jeden z produktów hydrolizy, a mianowicie nukleozyd, jest z tego środowiska usuwany – w przypadku 2CdA przez trójstopniową fosforylację, a w przypadku dA także przez dezaminację. Usuwanie z wnętrza komórki jednego z produktów hydrolizy estru powinno prowadzić do akumulacji w tym środowisku drugiego produktu – cytotoksycznego kwasu organicznego – i potęgować jego cytotoksyczność.

Należy jednak zauważyć, że aby ester nukleozydu zachowywał się zgodnie z hipotezą roboczą, musi być spełniony szereg warunków: 1. ester musi być efektywnie pobierany przez komórki docelowe, 2. jego hydroliza w środowisku wewnątrzkomórkowym sprzężona musi być z usuwaniem nukleozydu przez reakcje fosforylacji (w przypadku 2CdA) i/lub dezaminacji (w przypadku dA), oraz 3. kwas organiczny uwolniony z estru musi wywierać wpływ cytotoksyczny na komórki. Warunki te zaś z różnych powodów mogą nie być spełnione. Dla przykładu, ester nie będzie efektywnie pobierany przez komórki docelowe, jeśli jest bardzo niestabilny w środowisku wodnym, bądź jeśli nie będzie mógł dotrzeć do komórek z innych przyczyn. Ta druga sytuacja mogłaby nastąpić wówczas, gdy ester co prawda nie podlega spontanicznej hydrolizie, ale jest tak podatny na hydrolizę enzymatyczną, że zostanie rozłożony przez esterazy zawarte w osoczu krwi, w wątrobie bądź w innych tkankach wcześniej, niż wejdzie do komórek docelowych. Do akumulacji kwasu organicznego w komórkach po hydrolizie estru nie dojdzie również, gdy kwas (lub jego metabolity) będzie (będą) z wnętrza komórki szybko usuwany(e). Z kolei gdyby hydroliza estru następowała w innym przedziale komórkowym niż ten, w którym znajdują się wewnątrzkomórkowe enzymy fosforylujące 2CdA czy enzym dezaminujący dA, to nie dochodziłoby do wewnątrzkomórkowej akumulacji 2CdA w formie fosforanów czy do usuwania dA przez dezaminację – a przecież to te procesy warunkują zwiększony napływ kwasu do komórek docelowych. Wreszcie, uwolniony z nukleozydu kwas karboksylowy mógłby nie być cytotoksyczny lub być mniej cytotoksyczny wobec komórek docelowych ze względu na jednoczesne działanie uwolnionego równolegle nukleozydu powodujące antagonizm efektów cytotoksycznych.

Dla bezpośredniego sprawdzenia hipotezy o zwiększonym wychwycie składników estru w porównaniu do substancji macierzystych przez komórki limfoidalne należałoby wykonać doświadczenia z ekspozycją komórek na równomolowe ilości znakowanego radioaktywnie estru lub znakowanych radioaktywnie związków macierzystych. Jeśli hipoteza robocza jest prawdziwa, w komórkach inkubowanych z radioaktywnym estrem nastąpiłaby większa akumulacja radioaktywności. Jednak radioaktywnie znakowane estry dA i 2CdA z LA i CLB nie były dostępne. W związku z tym wykonano eksperymenty, które miały w sposób pośredni zcharakteryzować gromadzenie w komórkach nukleozydów uwolnionych z estrów. Eksperymenty te polegały na badaniu wpływu inkubacji komórek z estrami lub ich substancjami macierzystymi na wychwyt radioaktywnych macierzystych nukleozydów (dA i 2CdA).

Aby zaplanować czas trwania tego rodzaju doświadczeń, w pierwszej kolejności ustalono, przez jaki czas komórki inkubowane z radionukleozydem będą go gromadzić. W tym celu komórki KJKO i HL60 inkubowano z $[8\text{-}^{14}\text{C}]2\text{CdA}$ i w 10-cio minutowych

odstępach wyznaczano zgromadzoną w nich radioaktywność. Kinetyki wychwytu radionukleozydu przez nowotworowe i nienowotworowe komórki (**Ryc. 21**, str. 48) wykazały, że proces ten osiąga stan zbliżony do równowagi po ok. 45 minutach. W związku z powyższym dalsze doświadczenia przeprowadzano w czasie ograniczonym do 40 min.

W kolejnych doświadczeniach komórki preinkubowano z 1 μM roztworami substancji badanych (estrów lub ich związków macierzystych) i następnie dodawano znakowany radioaktywnie macierzysty nukleozyd, lub współinkubowano z mieszaninami zawierającymi 1 μM substancji badanych i radionukleozyd. Przyjęto, że wychwyty radionukleozydu będzie tym mniejszy, im szybciej transportowany jest do wnętrza komórek nieradioaktywny ester lub związek macierzysty. Okazało się, że krótka (10 min.) preinkubacja komórek MOLT4 z dA-CLB w obecności inhibitora ADA zmniejszała wychwyty $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{dA}$ ($p < 0,01$), podczas gdy substancje macierzyste tego związku (ani oddzielnie, ani w równomolarnej mieszaninie) nie miały na ten proces wpływu (**Ryc. 22**, panel **B**, str. 49). Uzyskane wyniki sugerowały dwie możliwości: albo kontakt komórek z dA-CLB stopniowo blokuje lub unieczynnia białka transportujące nukleozyd (np. alkilując je), albo ester jest szybciej niż dA transportowany do wnętrza komórek. Jednak dA jest wytwarzana wewnątrz komórek *de novo* i alkilacja białka transportującego nukleozyd w niewielkim zapewne stopniu wpłynęłaby na ich przeżywalność. Ester dA-CLB nie byłby więc znacznie bardziej cytotoksyczny od niezestryfikowanego CLB, a tak właśnie okazało się w dalszych eksperymentach (**Ryc. 26**, str. 55). Bardziej prawdopodobna jest zatem druga ewentualność, szybsze wchodzenie estru do wnętrza komórek. Podobnie można zinterpretować wyniki eksperymentów, w których linie komórkowe współinkubowano z $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{nukleozydem}$ i estrem CLB lub radionukleozydem i odpowiednim niezestryfikowanym nukleozydem. Okazało się, że dA-CLB istotnie silniej hamował akumulację radioaktywności ^{14}C przez komórki MOLT4, niż przez komórki linii HL60 i komórki KJKO. Na dodatek, ester dA-CLB istotnie silniej hamował wychwyty radioaktywności przez komórki MOLT4 niż niezestryfikowana dA (**Ryc. 23**, panel **A**, str. 50). Interesujące jest przy tym, że wyniki doświadczeń z estrem 2CdA-CLB i radioaktywną 2CdA (**Ryc. 23**, panel **B**, str. 50) były podobne do wyników doświadczeń z estrem dA-CLB i radioaktywną dA – choć z punktu widzenia toksyczności jedynie ester CLB zachowywał się zgodnie z hipotezą roboczą.

Pomiary toksyczności badanych związków wobec komórek MOLT4 wykazały, że cytotoksyczność estru 2CdA-LA po inkubacji 96-godzinnej jest porównywalna z cytotoksycznością równomolarnej mieszaniny 2CdA i LA, podczas gdy po inkubacji 48-godzinnej jest znamiennej mniejsza (w zakresie stężeń 0,5-5 μM ; zob. **Ryc. 25**, str. 54). Natomiast zarówno ester dA-LA, jak i równomolarna mieszanina dA i LA nie są dla

komórek w badanym zakresie stężeń (5 nM-5 μ M) toksyczne (**Ryc. 27**, str. 56). Z kolei 0,5 μ M i 5 μ M stężenia 2CdA-CLB były bardziej cytotoksyczne od takich samych stężeń CLB dla obu czasów inkubacji, ale w doświadczeniu 48-godzinnym równomolarna mieszanina 0,5 μ M 2CdA i CLB była bardziej cytotoksyczna od takiego samego stężenia estru (**Ryc. 24**, str. 53). Ten ostatni wynik sugeruje, że zamiast oczekiwanego synergizmu lub addytywności cytotoksycznych efektów 2CdA i CLB uwalnianych z estru, wewnątrz komórek zachodzą interakcje "osłabiające" cytotoksyczne efekty przynajmniej jednego, a być może obu leków i prowadzące do ich antagonizmu. Jedynie ester dA-CLB okazał się bardziej toksyczny od macierzystego kwasu karboksylowego – i to mimo, że mieszanina dA i CLB nie była bardziej cytotoksyczna od samego CLB (**Ryc. 26**, str. 55). Zresztą, zgodnie z przewidywaniami, sama dA nie wykazywała toksyczności wobec komórek limfoidalnych – większa cytotoksyczność estru dA-CLB w porównaniu do samego CLB nie jest więc wynikiem synergizmu pomiędzy składnikami estru.

Różnice pomiędzy wynikami doświadczeń z estrami LA i estrami CLB wynikają zapewne z różnych mechanizmów działania tych dwóch kwasów karboksylowych na komórki. Donoszono, że LA aktywuje apoptozę komórek białaczkowych, ale efekt ten miał miejsce dopiero przy stężeniach milimolarnych [122; 178]. Być może poziom LA w komórkach, mimo działania mechanizmu zgodnego z hipotezą roboczą, nie osiągał stężeń milimolarnych. Mogło przecież dochodzić do usuwania z komórek wolnego LA, np. na drodze biernej dyfuzji. Niewykluczone, że podczas inkubacji z estrami dA-LA czy 2CdA-LA stężenie LA wewnątrz komórek osiągało wartości nie milimolarne, lecz mikromolarne – a to mogłoby wyjaśniać, dlaczego ester 2CdA-LA był mniej cytotoksyczny od ekwimolarnej mieszaniny jego substancji macierzystych (2CdA i LA). Wykazano bowiem, że mikromolarne stężenia LA nie są cytotoksyczne, lecz cytoprotekcyjne – zapobiegają apoptozie stabilizując błony lizosomalne [129], przywracają prawidłowe funkcje ludzkich komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej pacjentów chorych na nowotwory złośliwe [111], oraz powodują wzrost stężenia tioli wewnątrzkomórkowych (np. GSH), chroniąc komórki przed apoptozą [162]. Natomiast jeśli chodzi o CLB, to jego właściwości alkilujące sprawiają, że związek ten wchodzi w reakcje chemiczne ze składnikami różnych struktur komórkowych i jest toksyczny wobec komórek nowotworowych już w stężeniach $\geq 1 \mu$ M (zob. rozdz. 1.4.2, str. 22). Ponadto, nawet jeśli CLB (lub jego metabolity) ulegałyby usuwaniu z komórki, nie zapobiegłoby to ich toksycznemu oddziaływaniu. Stopień zniszczenia wnętrza komórki decydujący o cytotoksyczności estru może bowiem być proporcjonalny nie do równowagowego stężenia uwolnionego z estru CLB (i jego metabolitów) w środowisku

wewnątrzkomórkowym, lecz do wielkości „strumienia” CLB który „przepływa” przez komórki podczas ich ekspozycji na lek.

W wielu eksperymentach klinicznych obserwowano dobre wyniki sekwencyjnego lub jednoczesnego podawania kladrybiny i leku alkilującego (zwykle stosowano cyklofosfamid) [101; 118; 144; 145; 147; 169]. Z tego względu połączenie wiązaniem estrowym kladrybiny i chlorambucylu wydawało się pomysłem szczególnie atrakcyjnym. Chlorambucyl przechodzi przez błony komórkowe na drodze dyfuzji biernej, natomiast 2CdA jest transportowany za pomocą białek transportujących nukleozydy, a wewnątrz komórek limfoidalnych podlega fosforylacji. Po podaniu do zawiesiny komórek równomolarnej mieszaniny 2CdA i CLB sumaryczne wewnątrzkomórkowe stężenie 2CdA i jej fosforanów powinno być wielokrotnie większe niż stężenie równowagowe CLB. Natomiast podanie do zawiesiny komórek estru 2CdA-CLB, gdyby jego hydroliza zachodziła dopiero wewnątrz komórki, powinno skutkować podobnym lub zbliżonym wewnątrzkomórkowym uwalnianiem obu składników estru. Nawet biorąc pod uwagę hipotetyczny proces usuwania CLB z komórki, „strumień” CLB który „przepłynął” przez komórki podczas ich ekspozycji na ester i tak powinien być wielokrotnie większy, niż po ekspozycji na niezestryfikowany CLB. Można było więc oczekiwać, że 2CdA-CLB będzie bardziej cytotoksyczny od mieszaniny macierzystych leków, a już na pewno bardziej cytotoksyczny od każdego z nich. Tymczasem wyniki doświadczeń, w których porównano cytotoksyczność estru 2CdA-CLB i jego substancji macierzystych wobec hodowli komórkowych, w zaskakujący sposób nie potwierdziły tych przewidywań.

Uprzednio opublikowano kilka doniesień o toksyczności wobec komórek białaczkowych 2CdA i CLB stosowanych sekwencyjnie lub równocześnie. Jedno z nich dotyczyło sekwencyjnej ekspozycji limfocytów izolowanych z krwi pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną, na CLB i 2CdA. Komórki te inkubowano najpierw z CLB przez 6 godzin, a następnie z 2CdA przez 18 godzin lub odwrotnie, najpierw przez 18 godzin z 2CdA a potem przez 6 godzin z CLB. W większości (10/12) badanych przypadków odpowiedź cytotoksyczna mierzona po 72 godz. od zakończenia ekspozycji na drugi lek była kilkukrotnie (od 2,3 do 7,5 raza) większa niż odpowiedź na każdy z tych leków oddzielnie, ale tylko wówczas, gdy komórki eksponowano najpierw na CLB, a następnie na 2CdA. Ustalono, że zjawisko to nie było związane ani z aktywacją procesów naprawy DNA i zwiększoną inkorporacją 2CdA do DNA komórek uprzednio eksponowanych na CLB, ani z hamowaniem w tych komórkach procesów reperacji DNA przez 2CdA [10]. W innej pracy [28] interakcje między 2CdA i CLB badano inkubując izolowane od pacjentów komórki przewlekłej białaczki limfatycznej z CLB i 2CdA jednocześnie. W 34,8% kombinacji różnych dawek obu leków uzyskano synergizm, a w 15,7% – efekt addytywny. W połowie przypadków obserwowano jednak brak

addytywności, bądź nawet antagonizm 2CdA i CLB. Mniejszą toksyczność mieszaniny 2CdA i CLB w porównaniu do toksyczności samego 2CdA zaobserwowano również w hodowlach komórek ludzkich chłoniaków SUDHL-4 i SUDHL-6 [85].

Jedną z przyczyn antagonizmu pomiędzy CLB i 2CdA może być alkilujące działanie CLB na enzymy komórkowe, w tym w szczególności na enzymy fosforylujące nukleozyd. Jeśli po podaniu estru 2CdA-CLB dochodzi do akumulacji CLB wewnątrz komórek bądź do zwiększenia „strumienia” CLB przepływającego przez komórki, to może dochodzić również do większej inaktywacji tych enzymów, a wówczas cytotoksyczna akumulacja 2CdA w postaci fosforanów byłaby mniejsza niż po ekspozycji komórek na samo 2CdA. Inną możliwą przyczyną tego zjawiska może być uszkodzenie przez lek alkilujący białek enzymatycznych zaangażowanych w proces apoptotycznej śmierci komórek zachodzącej w odpowiedzi na kładrybinę. Ze względu na popularność leków alkilujących (przede wszystkim cyklofosfamidu) w wielolekowych schematach terapii białaczek zagadnienie to powinno być przedmiotem dalszych badań.

Wyniki eksperymentów, w których dA-CLB okazał się bardziej toksyczny od samego CLB wobec komórek MOLT4, były przesłanką do zbadania toksyczności tego związku wobec innych linii komórkowych. Wartości IC_{50} dla dA-CLB i CLB dla trzech badanych linii (MOLT4, HL60 i K562, **Ryc. 29-31**, str. 58-60; **Tab. IV**, str. 52) wskazują, że we wszystkich przypadkach ester ten jest bardziej cytotoksyczny od macierzystego kwasu karboksylowego. Dalszym potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki doświadczeń wykonanych przez zespół prof. Vilpo z Uniwersytetu w Tampere, w Finlandii (dane zawarte w zgłoszeniu patentowym PL368093, [77]) na liniach komórkowych kilku nowotworów hematologicznych, a mianowicie ostrej białaczki szpikowej (KG-1), ostrej białaczki limfatycznej z komórek T (CEM i MOLT-3), białaczki włochatokomórkowej (Jok-1) i ostrej białaczki limfatycznej z komórek B (BALL). Hodowle komórkowe ekspozowano na różne stężenia CLB lub dA-CLB przez 72 godziny, a przeżywalność komórek po upływie tego czasu mierzono przy pomocy testu wykluczania barwnika Trypan blue. Wartości IC_{80} , czyli stężenia hamujące wzrost komórek o 80% zestawione są w **Tab. V**. Wyrażona w mikromolach wartość IC_{80} dla estru dA-CLB była niższa niż IC_{80} dla CLB dla wszystkich badanych linii komórkowych, przy czym największą wartość IC_{80} zanotowano dla komórek ostrej białaczki szpikowej KG-1.

Przedstawione powyżej wyniki eksperymentów *in vitro* skłaniają do wniosku, że ester dA-CLB jest związkiem o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych niż niezestryfikowany CLB – gdyż jest, w przeliczeniu na stężenie molowe, bardziej toksyczny wobec komórek nowotworowych. Jednak kilkukrotnie silniejsze działanie estru dA-CLB w porównaniu z samym CLB na linie komórkowe *in vitro* nie może być uznane

Tabela V. Wartości IC_{80} dla CLB i dA-CLB wyznaczone na podstawie doświadczeń na hodowlach komórkowych.

Linia komórkowa	IC_{80} (μM)	
	CLB	dA-CLB
CEM	10	7,1
Jok-1	25	8,3
KG-1	27	9,8
MOLT-3	7,0	2,3
BALL	8,0	4,5

za gwarancję wyższej skuteczności przeciwnowotworowej tej postaci chlorambucylu *in vivo*. Estrowy prolek chlorambucylu może bowiem w organizmie ulegać szybkiej hydrolizie katalizowanej przez powszechnie występujące w organizmach ssaków esterazy (karboksylesterazy). Znacząca aktywność esteraż występuje w wielu tkankach: w nerkach, jelicie cienkim, skórze, mięśniach, płucach, a także w osoczu i w komórkach krwi. Największa aktywność tych enzymów występuje w wątrobie i uważa się, że proleki estrowe są hydrolizowane głównie w tym narządzie [90; 156]. Wyniki wykonanych w niniejszej pracy eksperymentów z pomiarami tempa hydrolizy wskazują, że ester dA-CLB jest stosunkowo wolno (np. wolniej niż estry dA-LA i 2CdA-LA; por. **Ryc. 16** i **17**, str. 41-42) hydrolizowany przez esterazy osocza krwi, jest natomiast znacznie szybciej rozkładany przez esterazy obecne we wnętrzu komórek limfoidalnych. Jednakże aktywność esterazy w wątrobie jest znacznie wyższa niż w osoczu i wyższa niż w limfocytach. Nie jest więc wykluczone, że po podaniu do organizmu ester dA-CLB ulegnie hydrolizie (np. w wątrobie) szybciej, niż zdoła osiągnąć komórki docelowe. W takim zaś przypadku toksyczność estru dA-CLB *in vivo* byłaby identyczna jak toksyczność niezestryfikowanego chlorambucylu i dalsze badania nad właściwościami tej substancji byłyby nieuzasadnione.

Aby wykluczyć (lub potwierdzić) tę możliwość, porównano toksyczność ostrą estru 2CdA-CLB i niezestryfikowanego CLB. Badania przeprowadzone zostały na dojrzałych samicach myszy szczepu BALB/c w Instytucie Przemysłu Organicznego w Pszczynie. Testowane związki podawano dootrzewnowo w postaci roztworów, w DMSO. Wartości LD_{50} (obliczone metodą regresji logarytmiczno-probitowej) wyniosły 159 $\mu mol/kg$ m.c. dla CLB i 188 $\mu mol/kg$ m.c. dla dA-CLB ($p < 0,05$). Oznacza to, że wolny chlorambucyl jest molowo bardziej toksyczny, niż jego ester z 2'-deoksyadenozyną. Co więcej, u zwierząt, którym podawano CLB, występowały drgawki (które są wykładnikiem neurotoksyczności), natomiast tego objawu nie stwierdzono u zwierząt, którym podawano dA-CLB [195]. Warto wspomnieć, że inny prolek chlorambucylu, a mianowicie koniugat CLB z poliaminą, spermidyną, był co prawda 2 do 3 razy bardziej toksyczny

wobec limfocytów, ale jego neurotoksyczność była dziesięciokrotnie wyższa niż neurotoksyczność wolnego CLB [184].

Czy warto kontynuować badania nad estrem dA-CLB? Czy substancja ta ma szansę stać się klinicznie użytecznym lekiem? Nie jest to przecież jedyny prolek chlorambucylu, jaki został zsyntetyzowany i poddany ocenom w badaniach przedklinicznych. Przeciwnie, takich proleków było bardzo wiele – ale żaden z nich (z jednym mało znaczącym wyjątkiem, którym jest preparat prednimustyna, patrz niżej) nie został zarejestrowany jako lek.

Doniesienia o syntezie pochodnych CLB, które miały mieć słabsze działania niepożądane niż CLB i/lub być efektywniej pobierane przez komórki docelowe pojawiły się już w latach 70-tych. W 1972r. zsyntetyzowano koniugaty CLB z przeciwciałami przeciwko powierzchniowym antygenom nowotworowym (ang. *tumor-associated antigens*), które występują w dużej ilości na powierzchni komórek nowotworowych – okazały się one jednak nieprzydatne ze względu na niezadowalającą powtarzalność syntez [60; 61]. Udoskonalenie syntez pozwoliło uzyskać koniugaty, które wykazywały swoistość i były bardziej cytotoksyczne *in vitro* od substancji macierzystych [11; 176], a ich toksyczność obwodowa była mniejsza od toksyczności samego CLB [164; 165]. Pod koniec lat 90 zsyntetyzowano koniugaty CLB z niektórymi białkami występującymi naturalnie u człowieka, albuminą i transferyną. Były one testowane na liniach komórkowych białaczki (MOLT4) i raka piersi MCF-7, i okazało się, że ich aktywność przeciwnowotworowa była kilku-kilkunastokrotnie wyższa od aktywności samego CLB; badania na myszach wykazały ponadto mniejszą toksyczność obwodową tych związków w porównaniu z toksycznością CLB [15; 100].

Do syntezy proleków CLB wykorzystano także proste związki alifatyczne i aromatyczne. W doświadczeniach na szczurach stwierdzono, że okres półtrwania takich pochodnych w osoczu krwi był krótszy, niż okres półtrwania CLB i były one mniej aktywne przeciwnowotworowo [74]. W przypadku tert-butyłowego estru CLB uzyskano jednak kilkukrotnie silniejszą penetrację związku przez barierę krew-mózg w porównaniu do CLB, co skłoniło badaczy do zaproponowania użycia tego związku w terapii nowotworów mózgu [73]. Następnie zsyntetyzowano szereg pochodnych CLB z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, m. in. z kwasem arachidonowym. W doświadczeniach na hodowlach komórkowych zaobserwowano, że aktywność przeciwnowotworowa tych związków była równa lub wyższa od aktywności przeciwnowotworowej CLB. Stwierdzono również, że związki te były bardziej wybiórcze w swoim działaniu, tzn. cechowały się mniejszą toksycznością wobec komórek normalnych [3].

Do konstruowania prolekowych pochodnych CLB używano również substancji, które są selektywnie wychwytywane przez komórki nowotworowe. Przykładem takich proleków są koniugaty CLB z cukrami [89], proliną [18; 19], cyklicznymi peptydami [163] lub pochodnymi glicerolu [59]. Związki te, np. wspomniany już koniugat CLB ze spermidyną [184], były niekiedy bardziej toksyczne od samego CLB wobec komórek nowotworowych, ale ich działania niepożądane *in vivo* bywały również znacznie silniejsze.

Inną grupę proleków uwalniających CLB stanowiły koniugaty CLB z glikolem polietylenowym (PEG) o różnej długości łańcucha. Aby poprawić selektywność działania takich koniugatów, do drugiego końca łańcucha PEG przyłączano sulfadiazynę – substancję, która ulega wybiórczej akumulacji w niektórych typach nowotworów. Doświadczenia *in vitro* i *in vivo* wykazały wyższość takich koniugatów nad związkami niezawierającymi reszty sulfadiazynowej. Aktywność przeciwnowotworowa pegyloowanych postaci CLB okazała się jednak słabsza od aktywności wolnego CLB [92].

CLB wiązano również chemicznie z substancjami o aktywności przeciwnowotworowej bądź hormonalnej. Spośród kilkunastu zbadanych związków CLB z pochodnymi antrachinowymi, osiem było bardziej toksycznych od CLB wobec komórek mysiej białaczki L1210, a dwa okazały się być również bardziej aktywne od związków macierzystych wobec komórek mysiego mięsaka S-180 *in vivo* [93]. Także jeden z estrów chlorambucylu z paclitaxelem był bardziej toksyczny wobec komórek mysiego raka płuc M109 *in vivo* niż którykolwiek z leków macierzystych lub ich mieszanina [192]. Wśród „dwufunkcyjnych” pochodnych CLB znalazły się także związki tego leku z hormonalnie czynnymi steroidami. Co ciekawe, to spośród nich pochodzi ester prednizolonu i CLB (INN: *prednimustine*) będący jedynym lekiem, który przeszedł pomyślnie badania kliniczne [24; 117] i znalazł ograniczone zastosowanie kliniczne w monoterapii lub kombinacji z innymi lekami, w leczeniu niektórych chorób hematoonkologicznych [86].

Opisane w literaturze naukowej pochodne chlorambucylu były więc bardzo różnorodne i niejednokrotnie wysoce oryginalne pod względem koncepcji syntezy, budowy chemicznej, oraz właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Jednakże, z wyjątkiem wspomnianej powyżej prednimustyny, żadna z nich nie została dotychczas zarejestrowana jako lek. Być może prace nad niektórymi z wspomnianych powyżej rozwiązań trwają nadal, a nad innymi zostały przerwane z przyczyn pozamerytorycznych (np. brak ochrony patentowej). Pojawiają się jednak ciągle publikacje opisujące kolejne proleki chlorambucylu, co wskazuje, że „doskonalenie” tego leku nadal uważane jest za kierunek badawczy mogący przynieść praktycznie użyteczne rozwiązania. W tym kontekście podkreślić należy, że badany w niniejszej pracy 5'-O-ester dA-CLB nie jest

podobny do żadnych dotychczas znanych rozwiązań. Jedynymi opisanymi dotychczas związkami dA i CLB są addukty tworzące się podczas ich współinkubacji w fizjologicznym pH, ale powstają one w wyniku reakcji CLB z atomami azotu (N1, N3, N6, N7) pierścienia purynowego dA [53] – a więc są strukturalnie zupełnie odmienne. W oparciu o wyniki omówionych powyżej badań cytotoksyczności wobec linii komórkowych *in vitro* i toksyczności ostrej *in vivo* 5'-O-ester dA i CLB został zgłoszony do patentu [77]. Odpowiedź na pytanie o jego przyszłość jako leku przynieść mogą jedynie dalsze badania na modelach *in vivo*, a potem – ewentualnie – badania kliniczne.

5.2. Estry 2CdA z polimerem kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego

Chromatograficzna analiza preparatów AK1 i AK2 wykazała, że każdy z nich był mieszaniną wielu składników różniących się czasami retencji. Różnice te prawdopodobnie wynikają z różnej liczby merów (R,S)- β -hydroksymaślanu w łańcuchu polimerowym. W chromatogramach obu badanych preparatów występowały bowiem piki o podobnych czasach retencji, a różnice dotyczyły ilościowego udziału poszczególnych składników w mieszaninie (**Ryc. 15**, str. 38). Zastosowany w układzie chromatograficznym detektor nie pozwolił na ustalenie ewentualnej obecności w preparatach AK1 i AK2 łańcuchów PHB niezawierających nukleozydu, gdyż sam PHB nie wykazuje istotnej absorpcji w zakresie UV. Stopień zanieczyszczenia badanych preparatów łańcuchami niezawierającymi nukleozydu można jednak ustalić porównując średnią długość łańcucha wyznaczoną przy pomocy metody GPC (która nie uwzględnia różnicy pomiędzy łańcuchami zakończonymi i niezakończonymi nukleozydem), a średnią długość łańcucha wyznaczoną w niniejszej pracy w oparciu o wyniki spektrofotometryczne. Dość dobra zgodność obu ocen (zob. **Tab. II**, str. 37) pozwala sądzić, że zanieczyszczenie to nie było duże.

Przebieg hydrolizy AK1 i AK2 przez esterazę wątrobową pozwala wykluczyć, że szczególnie podatne na hydrolizę są wiązania estrowe między 2CdA, a łańcuchem PHB. Gdyby to właśnie wiązanie preferencyjnie ulegało hydrolizie, wysokości poszczególnych pików chromatogramu obniżałyby się równomiernie. Tymczasem w ciągu pierwszych 6-8 godzin hydrolizy obserwowano wzrost udziału składników o krótszych czasach retencji (zapewne estrów o krótszych łańcuchach) kosztem składników o dłuższych czasach retencji (przypuszczalnie estrów o dłuższych łańcuchach) (**Ryc. 20**, str. 45). Zachodzący w tym samym czasie wzrost udziału niezestryfikowanej 2CdA w badanej mieszaninie wskazuje, że hydrolizie nie ulegały wyłącznie wiązania estrowe wewnątrz łańcucha PHB, ale także wiązanie estrowe z nukleozydem. Najbardziej prawdopodobne jest, że wiązania estrowe na krańcach i we wnętrzu łańcucha podlegały hydrolizie z podobną szybkością.

W trakcie enzymatycznej hydrolizy preparatów AK1 i AK2 zaobserwowano na chromatogramach pojawianie się pików substancji niewykrywanych przed hydrolizą (Tab. III, str. 46). Być może przed rozpoczęciem hydrolizy związków tych nie było lub ich stężenie w roztworze było zbyt niskie, aby algorytm analizujący chromatogram wykrył je lub odróżnił od pików związków o zbliżonym czasie retencji obecnych w znacznie większej ilości. Jest także możliwe, że podczas hydrolizy tworzą się niewielkie ilości substancji o charakterze oligomerów nieliniowych (np. oligomery cykliczne). Dokładna charakterystyka wszystkich produktów hydrolizy badanych preparatów polimerowych, wymagająca zastosowania metod analizy strukturalnej takich jak chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową (LC-MS), było poza zakresem niniejszej rozprawy.

Uwalnianie 2CdA z preparatów AK1 i AK2 pod wpływem esterazy było o 2-3 rzędy wielkości wolniejsze, niż uwalnianie tego nukleozydu z estrów 2CdA-LA i 2CdA-CLB (por. Ryc. 18 z Ryc. 16 i 17, str. 41-43). W ciągu pierwszej godziny hydrolizy z estru 2CdA-LA uwalniane było ok. 95%, z estru 2CdA-CLB – ok. 45%, a z AK1 i AK2 – mniej niż 1% nukleozydu. Obserwacja ta może być częściowo wyjaśniona przez to, że substratem dla hydrolizy enzymatycznej są wiązania estrowe. Zauważyć należy, że w przypadku estrów z kwasami niskocząsteczkowymi stężenie molowe wiązań estrowych jest takie samo jak stężenie molowe nukleozydu, ale w przypadku estrów z polimerami jest ono prawie o rząd wielkości wyższe niż stężenie nukleozydu. Są dwa możliwe wyjaśnienia wolniejszej hydrolizy estrów 2CdA z łańcuchami PHB w porównaniu do estrów z kwasami niskocząsteczkowymi. Po pierwsze, jest możliwe, że wiązania estrowe w łańcuchach PHB hydrolizują znacznie wolniej niż wiązania w estrach niskocząsteczkowych. Jednakże wówczas należałoby spodziewać się szybkiego przebiegu ostatniego etapu hydrolizy, a więc rozpadu wiązania między kladrybiną i kwasem β -hydroksymasłowym, a przeto odpowiadający temu estrowi pik na chromatogramie (prawdopodobnie jest to pik nr I, zob. Ryc. 15, str. 38; Ryc. 20, str. 45; Tab. III, str. 46) powinien być znacznie mniejszy, niż następne piki. Takie zjawisko jednak nie zostało zaobserwowane. Wyjaśnieniem alternatywnym i bardziej prawdopodobnym jest więc to, że hydroliza wiązań estrowych zarówno kladrybiny z kwasem β -hydroksymasłowym, jak i pomiędzy dwoma resztami β -hydroksymasłanu przebiega znacznie wolniej, niż hydroliza wiązań estrowych w innych badanych w niniejszej pracy estrach.

Polimery kwasu β -hydroksymasłowego są lipofilowe, a więc ich przyłączenie do substancji hydrofilowej (takiej jak nukleozyd) nada jej właściwości hydrofobowe. Przyłączenie PHB doprowadzi więc do odwrotnych efektów, jak przyłączenie PEG (glikolu polietylenowego), polimeru najczęściej używanego w farmacji do stabilizacji leków oraz do zwiększania ich rozpuszczalności w wodzie. Postawić więc można

pytanie, czy koniugaty 2CdA (bądź innych leków cytotoksycznych) z PHB mogą znaleźć jakieś zastosowanie medyczne, czy też rozwiązanie to należy uznać za „ciekawostkę laboratoryjną” pozbawioną praktycznego znaczenia.

Istotnie, wiele leków (w tym cytostatyków) jest słabo rozpuszczalne w wodzie, a wówczas znaczenie praktyczne ma zwiększanie ich hydrofilowości. Są jednak również sytuacje, w których farmakologicznie korzystne jest zwiększenie lipofilowości cytostatyków hydrofilowych. Po pierwsze, wiele typów komórek nowotworowych wykazuje na swojej powierzchni zwiększoną gęstość receptorów dla lipoprotein LDL [109; 186] i od ponad 20 lat prowadzone są prace nad wykorzystaniem LDL-i do selektywnego wprowadzania cytostatyków oraz radiofarmaceutyków do nowotworów [45-47; 49; 106]. Jednak jeśli cytostatyk jest rozpuszczalny w wodzie, dla wytworzenia stabilnego kompleksu z LDL-ami trzeba użyć jego pochodnej lipofilowej [79; 113; 185]. Koniugaty z krótkołańcuchowymi polimerami PHB miałyby w tym zastosowaniu istotną zaletę, bowiem po wejściu do komórek docelowych uwalnianie leku z koniugatu polimerowego zachodziłoby powoli, ze stałą szybkością.

Po drugie, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że ester 2CdA i PHB jest mniej toksyczny niż macierzysty nukleozyd wobec komórek białaczkowych MOLT4 (**Ryc. 28**, str. 57), a więc ta postać leku nie wydaje się interesująca w zastosowaniach hematoonkologicznych. Jednakże, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, koniugaty 2CdA i PHB mogą zasługiwać na kliniczne sprawdzenie w zastosowaniu do chemoembolizacji pierwotnego raka wątroby. Nowotwór ten, zwany hepatomą, występuje dość często – corocznie na świecie rejestruje się około 0,5-1 mln nowych przypadków [21]. Leczenie chirurgiczne (resekcja), układowa chemioterapia i radioterapia nie mają większego wpływu na przeżywalność pacjentów [20]. Często stosowanym sposobem leczenia hepatomy jest tzw. chemoembolizacja. Polega ona na podaniu do tętnicy zaopatrującej nowotwór mieszaniny leku przeciwnowotworowego (zazwyczaj antracykliny) i środka zamykającego światło naczyń (którym zwykle jest lipiodol, jodowany olej z nasion maku) [39; 173; 174]. W ten sposób osiąga się selektywne niedokrwienie okolicy guza oraz dostarcza cytostatyk do obszarów tkanek zajętych nowotworem. Po takim zabiegu często dochodzi do rozlanej nekrozy guza, ale całkowitą remisję choroby uzyskuje się rzadko. Chociaż u prawie 75% pacjentów leczonych w ten sposób uzyskuje się częściową lub całkowitą odpowiedź na leczenie, poprawa przeżywalności jest niewielka [2]. Tymczasem, zgodnie z doniesieniem Graziadei i wsp. [69], kładrybina jest bardzo silnie toksyczna wobec ludzkiej hepatomy – jej IC_{50} *in vitro* wobec linii HepG2 wynosi $16,7 \pm 0,4$ nM. Należy także zauważyć, że po jednorazowym podaniu rozpuszczonego w lipiodolu preparatu zawierającego 2CdA połączoną z polimerem PHB, takiego jak AK1 czy AK2, powinno dojść do utworzenia

wewnątrzkomórkowego depozytu estrów 2CdA-PHB, z którego esterazy wątrobowe uwalniać powoli będą cytotoksyczny nukleozyd. Jednak, podobnie jak w przypadku omówionego uprzednio estru dA z CLB, odpowiedź na pytanie o celowość klinicznego stosowania preparatów zawierających 2CdA zestryfikowaną polimerami PHB przynieść mogą jedynie dalsze badania doświadczalne i kliniczne.

6. WNIOSKI

1. Właściwości fizykochemiczne preparatów 5'-O-estrowych 2CdA i PHB wskazują, że substancje te mogłyby być przydatne jako proleki uwalniające kladrybinę w leczeniu pacjentów z guzami litymi o dużej aktywności dCK, np. z pierwotnym rakiem wątroby.

2. Porównanie właściwości fizykochemicznych, toksyczności wobec ludzkich białaczkowych linii komórkowych oraz toksyczności ostrej CLB oraz 5'-O-estru dA i CLB u myszy wskazuje, że ester dA-CLB mógłby znaleźć praktyczne zastosowanie, jako prolek, w zakresie podobnym lub większym od swego macierzystego cytostatyku.

3. Porównanie właściwości biologicznych (cytotoksyczności wobec ludzkiej białaczkowej linii komórkowej MOLT4) 5'-O-estru 2CdA-CLB i jego substancji macierzystych wskazuje na istnienie antagonizmu między substancjami czynnymi uwalnianymi wewnątrzkomórkowo z tego estru, co wydaje się wykluczać jego terapeutyczną przydatność.

4. Szybka hydroliza 5'-O-estrów 2CdA i dA z LA przez osocze krwi oraz dane eksperymentalne wskazujące (pośrednio) na nieefektywny wychwyt tych estrów przez komórki ludzkich linii białaczkowych, przemawiają przeciwko użyciu ich jako proleków w terapii chorób hematoonkologicznych.

7. PIŚMIENICTWO

1. Aggarwal S.K., Gogu S.R., Rangan S.R., Agrawal K.C. (1990) Synthesis and biological evaluation of prodrugs of zidovudine. *J. Med. Chem.*, 33 (5), 1505-1510
2. Alsowmely A.M., Hodgson H.J. (2002) Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16 (1), 1-15
3. Anel A., Halmos T., Torres J.M., Pineiro A., Antonakis K., Uriel J. (1990) Cytotoxicity of chlorambucil and chlorambucil-fatty acid conjugates against human lymphomas and normal human peripheral blood lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 40 (6), 1193-1200
4. Bailey R.R. (1989) Remission induced by chlorambucil in steroid-responsive, frequently relapsing nephrotic syndrome that relapsed after cyclophosphamide. *N. Z. Med. J.*, 102 (872), 379-381
5. Baldwin S.A., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D. (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol. Med. Today*, 5 (5), 216-224
6. Barankiewicz J., Danks A.M., Abushanab E., Makings L., Wiemann T., Wallis R.A., Pragnacharyulu P.V., Fox A., Marangos P.J. (1997) Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283 (3), 1230-1238
7. Barnard D.L. (2001) Pegasys (Hoffmann-La Roche). *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2 (11), 1530-1538
8. Begleiter A., Lee K., Israels L.G., Mowat M.R., Johnston J.B. (1994) Chlorambucil induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy. *Leukemia*, (8 Suppl 1), S103-S106
9. Begleiter A., Mowat M., Israels L.G., Johnston J.B. (1996) Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk. Lymphoma*, 23 (3-4), 187-201
10. Begleiter A., Wang H., Verburg L., Lee K., Israels L.G., Mowat M.R., Johnston J.B. (1996) In vitro cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine and chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 10 (12), 1959-1965
11. Bernier L.G., Page M., Gaudreault R.C., Joly L.P. (1984) A chlorambucil-anti-CEA conjugate cytotoxic for human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Br. J. Cancer*, 49 (2), 245-246
12. Betticher D.C., Fey M.F., von Rohr A., Tobler A., Jenzer H., Gratwohl A., Lohri A., Pugin P., Hess U., Pagani O., . (1994) High incidence of infections after 2-chlorodeoxyadenosine (2-CDA) therapy in patients with malignant lymphomas and chronic and acute leukaemias. *Ann. Oncol.*, 5 (1), 57-64
13. Beutler E. (1992) Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet*, 340 (8825), 952-956
14. Beutler E., Sipe J., Romine J., McMillan R., Zyroff J., Koziol J. (1996) Treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases with cladribine. *Semin. Hematol.*, 33 (1 Suppl 1), 45-52
15. Beyer U., Roth T., Schumacher P., Maier G., Unold A., Frahm A.W., Fiebig H.H., Unger C., Kratz F. (1998) Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *J. Med. Chem.*, 41 (15), 2701-2708
16. Bhana N., Ormrod D., Perry C.M., Figgitt D.P. (2002) Zidovudine: a review of its use in the management of vertically-acquired pediatric HIV infection. *Paediatr. Drugs*, 4 (8), 515-553

17. Bhargava R., Barbashina V., Filippa D.A., Teruya-Feldstein J. (2004) Epstein-Barr virus positive large B-cell lymphoma arising in a patient previously treated with Cladribine for hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 45 (5), 1043-1048
18. Bielawska A., Chrzanowski K., Bielawski K., Palka J. (2000) Decreased cytotoxicity and increased antimitotic activity of proline analogue of chlorambucil as a prodrug in breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pol. Pharm.*, 57 (Suppl), 103-105
19. Bielawska A., Chrzanowski K., Bielawski K., Palka J. (2001) Decreased cytotoxicity and increased antimitotic activity of a proline analogue of chlorambucil as a prodrug susceptible to the action of fibroblast's prolidase. *Pharmazie*, 56 (4), 290-294
20. Bloomston M., Binitie O., Fraiji E., Murr M., Zervos E., Goldin S., Kudryk B., Zwiebel B., Black T., Fargher S., Rosemurgy A.S. (2002) Transcatheter arterial chemoembolization with or without radiofrequency ablation in the management of patients with advanced hepatic malignancy. *Am. Surg.*, 68 (9), 827-831
21. Blum H.E. (2002) Molecular targets for prevention of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis.*, 20 (1), 81-90
22. Bonina F.P., Rimoli M.G., Avallone L., Barbato F., Arrato M., Puglia C., Ricci M., de Caprariis P. (2002) New oligoethylene ester derivatives of 5-iodo-2'-deoxyuridine as dermal prodrugs: synthesis, physicochemical properties, and skin permeation studies. *J. Pharm. Sci.*, 91 (1), 171-179
23. Bouchard V.J., Rouleau M., Poirier G.G. (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.*, 31 (6), 446-454
24. Brandt L., Konyves I., Moller T.R. (1975) Therapeutic effect of Leo 1031, an alkylating corticosteroid ester, in lymphoproliferative disorders. I. chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Med. Scand.*, 197 (4), 317-322
25. Breithaupt-Grogler K., Niebch G., Schneider E., Erb K., Hermann R., Blume H.H., Schug B.S., Belz G.G. (1999) Dose-proportionality of oral thioctic acid--coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8 (1), 57-65
26. Bryson H.M., Sorkin E.M. (1993) Cladribine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in haematological malignancies. *Drugs*, 46 (5), 872-894
27. Cai Y., Ludeman S.M., Wilson L.R., Chung A.B., Dolan M.E. (2001) Effect of O6-benzylguanine on nitrogen mustard-induced toxicity, apoptosis, and mutagenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cancer Ther.*, 1 (1), 21-28
28. Callea I., Console G., Sculli G., Filangeri M., Messina G., Morabito F. (1998) Chlorambucil synergizes with purine analogs in inducing in vitro cytotoxicity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 83 (8), 756-757
29. Carson D.A., Kaye J., Matsumoto S., Seegmiller J.E., Thompson L. (1979) Biochemical basis for the enhanced toxicity of deoxyribonucleosides toward malignant human T cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76 (5), 2430-2433
30. Carson D.A., Kaye J., Seegmiller J.E. (1978) Differential sensitivity of human leukemic T cell lines and B cell lines to growth inhibition by deoxyadenosine. *J. Immunol.*, 121 (5), 1726-1731
31. Carson D.A., Wasson D.B., Taetle R., Yu A. (1983) Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood*, 62 (4), 737-743
32. Cavaliere A., Pietropaoli N., Alberti P.F., Vitali R. (1990) Chlorambucil carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer Lett.*, 55 (2), 115-120

33. Cavallaro G., Pitarresi G., Licciardi M., Giammona G. (2001) Polymeric prodrug for release of an antitumoral agent by specific enzymes. *Bioconj. Chem.*, 12 (2), 143-151
34. Ceruti S., Franceschi C., Barbieri D., Malorni W., Camurri A., Giammarioli A.M., Ambrosini A., Racagni G., Cattabeni F., Abbracchio M.P. (2000) Apoptosis induced by 2-chloro-adenosine and 2-chloro-2'-deoxy-adenosine in a human astrocytoma cell line: differential mechanisms and possible clinical relevance. *J. Neurosci. Res.*, 60 (3), 388-400
35. Chave T.A., Mortimer N.J., Shah D.S., Hutchinson P.E. (2004) Chlorambucil as a steroid-sparing agent in bullous pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 151 (5), 1107-1108
36. Cheson B.D., Vena D.A., Barrett J., Freidlin B. (1999) Second malignancies as a consequence of nucleoside analog therapy for chronic lymphoid leukemias. *J. Clin. Oncol.*, 17 (8), 2454-2460
37. Choe Y.H., Conover C.D., Wu D., Royzen M., Gervacio Y., Borowski V., Mehlig M., Greenwald R.B. (2002) Anticancer drug delivery systems: multi-loaded N4-acyl poly(ethylene glycol) prodrugs of ara-C. II. Efficacy in ascites and solid tumors. *J. Control Release*, 79 (1-3), 55-70
38. Choe Y.H., Conover C.D., Wu D., Royzen M., Greenwald R.B. (2002) Anticancer drug delivery systems: N4-acyl poly(ethyleneglycol) prodrugs of ara-C. I. Efficacy in solid tumors. *J. Control Release*, 79 (1-3), 41-53
39. Chou F.I., Fang K.C., Chung C., Lui W.Y., Chi C.W., Liu R.S., Chan W.K. (1995) Lipiodol uptake and retention by human hepatoma cells. *Nucl. Med. Biol.*, 22 (3), 379-386
40. Christensen L.F., Broom A.D., Robins M.J., Bloch A. (1972) Synthesis and biological activity of selected 2,6-disubstituted-(2-deoxy- -and- -D-erythro-pentofuranosyl)purines. *J. Med. Chem.*, 15 (7), 735-739
41. Crews K.R., Gandhi V., Srivastava D.K., Razzouk B.I., Tong X., Behm F.G., Plunkett W., Raimondi S.C., Pui C.H., Rubnitz J.E., Stewart C.F., Ribeiro R.C. (2002) Interim comparison of a continuous infusion versus a short daily infusion of cytarabine given in combination with cladribine for pediatric acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 20 (20), 4217-4224
42. Das S., Kurcok P., Jedlinski Z., Reusch R.N. (1999) Ion channels formed by biomimetic oligo-(R)-3-hydroxybutyrates and inorganic polyphosphates in planar lipid bilayers. *Macromolecules*, 32 (4), 8781-8785
43. Davis J.C., Jr., Austin H., III, Boumpas D., Fleisher T.A., Yarboro C., Larson A., Balow J., Klippel J.H., Scott D. (1998) A pilot study of 2-chloro-2'-deoxyadenosine in the treatment of systemic lupus erythematosus-associated glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.*, 41 (2), 335-343
44. de Duve C., de Barse T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F. (1974) Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, 23 (18), 2495-2531
45. de Smidt P.C., van Berkel T.J. (1990) LDL-mediated drug targeting. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 7 (2), 99-120
46. de Smidt P.C., van Berkel T.J. (1990) Prolonged serum half-life of antineoplastic drugs by incorporation into the low density lipoprotein. *Cancer Res.*, 50 (23), 7476-7482
47. de Smidt P.C., van Berkel T.J. (1992) Characteristics of association of oleoyl derivatives of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate with low-density lipoproteins (LDL). *Pharm. Res.*, 9 (4), 565-569

48. Drablos F., Feyzi E., Aas P.A., Vaagbo C.B., Kavli B., Bratlie M.S., Pena-Diaz J., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, 3 (11), 1389-1407
49. Dubowchik G.M., Firestone R.A. (1995) Improved cytotoxicity of antitumor compounds deliverable by the LDL pathway. *Bioconjug. Chem.*, 6 (4), 427-439
50. Eibschutz B., Baird S.M., Weisman M.H., Amox D.G., Spellman M., Piacquadio D., Carrera C.J., Carson D.A. (1995) Oral 2-chlorodeoxyadenosine in psoriatic arthritis. A preliminary report. *Arthritis Rheum.*, 38 (11), 1604-1609
51. Everett J.L., Roberts J.J., Ross W.C.J. (1953) Aryl-2-halogenoalkylamines. Pt. XII. Some carboxylic derivatives of NN-Di-2-chloroethylaniline. *J. Chem. Soc.*, 3 (1), 2386-2392
52. Ezdinli E.Z., Stutzman L. (1965) Chlorambucil therapy for lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*, 191 (2), 444-450
53. Florea-Wang D., Haapala E., Mattinen J., Hakala K., Vilpo J., Hovinen J. (2003) Reactions of N,N-bis(2-chloroethyl)-p-aminophenylbutyric acid (chlorambucil) with 2'-deoxyadenosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 16 (3), 403-408
54. Food and Drug Administration. Strona wizytowana 15.08.2005r.
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/labels.cfm?GN=chlorambucil>
55. Freel Meyers C.L., Hong L., Joswig C., Borch R.F. (2000) Synthesis and biological activity of novel 5-fluoro-2'-deoxyuridine phosphoramidate prodrugs. *J. Med. Chem.*, 43 (22), 4313-4318
56. Fridrik M.A., Jager G., Kienzer H.R., Hausmaninger H., Oppitz P., Krieger O., Zabernigg A., Lang A., Neubauer M., Weidinger G., Schiller L., Seewann H.L., Chott A., Linkesch W. (1998) Efficacy and toxicity of 2-Chlorodeoxyadenosine (Cladribine)--2 h infusion for 5 days--as first-line treatment for advanced low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Cancer*, 34 (10), 1560-1564
57. Galton D., Wiltshaw E., SZUR L., Dacie J.W. (1961) The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 7(2), 73-98
58. Gandhi V., Estey E., Keating M.J., Chucrallah A., Plunkett W. (1996) Chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in patients with acute myelogenous leukemia: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and molecular interactions. *Blood*, 87 (1), 256-264
59. Garzon-Aburbeh A., Poupaert J.H., Claesen M., Dumont P., Atassi G. (1983) 1,3-dipalmitoyl-glycerol ester of chlorambucil as a lymphotropic, orally administrable antineoplastic agent. *J. Med. Chem.*, 26 (8), 1200-1203
60. Ghose T., Blair A.H. (1987) The design of cytotoxic-agent-antibody conjugates. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3 (4), 263-359
61. Ghose T., Norvell S.T., Guclu A., Cameron D., Bodurtha A., MacDonald A.S. (1972) Immunochemotherapy of cancer with chlorambucil-carrying antibody. *Br. Med. J.*, 3 (825), 495-499
62. Ghosh M.K., Mitra A.K. (1992) Brain parenchymal metabolism of 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5'-ester prodrugs. *Pharm. Res.*, 9 (8), 1048-1052
63. Giannecchini M., D'Innocenzo B., Pesi R., Sgarrella F., Iorio M., Collecchi P., Tozzi M.G., Camici M. (2003) 2'-Deoxyadenosine causes apoptotic cell death in a human colon carcinoma cell line. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17 (6), 329-337

64. Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F., Pollara B., Meuwissen H.J. (1972) Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*, 2 (7786), 1067-1069
65. Gogolewski S., Jovanovic M., Perren S.M., Dillon J.G., Hughes M.K. (1993) Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J. Biomed. Mater. Res.*, 27 (9), 1135-1148
66. Goldstein D.A., Fontanilla F.A., Kaul S., Sahin O., Tessler H.H. (2002) Long-term follow-up of patients treated with short-term high-dose chlorambucil for sight-threatening ocular inflammation. *Ophthalmology*, 109 (2), 370-377
67. Golembiowska K., Zylewska A. (2000) Effect of adenosine kinase, adenosine deaminase and transport inhibitors on striatal dopamine and stereotypy after methamphetamine administration. *Neuropharmacology*, 39 (11), 2124-2132
68. Goodman G.R., Burian C., Koziol J.A., Saven A. (2003) Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine. *J. Clin. Oncol.*, 21 (5), 891-896
69. Graziadei I., Kelly T., Schirmer M., Geisen F.H., Vogel W., Konwalinka G. (1998) Antitumor effect of the nucleoside analogs 2-chlorodeoxyadenosine and 2',2'-difluorodeoxycytidine on human hepatoma HepG2 cells. *J. Hepatol.*, 28 (3), 504-509
70. Greenwald R.B. (2002) Poly(ethylene glycol) anticancer drug delivery systems. *P. R. Health Sci. J.*, 21 (2), 113-121
71. Greenwald R.B., Choe Y.H., McGuire J., Conover C.D. (2003) Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55 (2), 217-250
72. Greenwald R.B., Conover C.D., Choe Y.H. (2000) Poly(ethylene glycol) conjugated drugs and prodrugs: a comprehensive review. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 17 (2), 101-161
73. Greig N.H., Daly E.M., Sweeney D.J., Rapoport S.I. (1990) Pharmacokinetics of chlorambucil-tertiary butyl ester, a lipophilic chlorambucil derivative that achieves and maintains high concentrations in brain. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 25 (5), 320-325
74. Greig N.H., Genka S., Daly E.M., Sweeney D.J., Rapoport S.I. (1990) Physicochemical and pharmacokinetic parameters of seven lipophilic chlorambucil esters designed for brain penetration. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 25 (5), 311-319
75. Grieb P., Ryba M., Stelmasiak Z., Nowicki J., Solski J., Jakubowska B. (1994) Cladribine treatment of multiple sclerosis. *Lancet*, 344 (8921), 538
76. Grieb P., Skierski J., Jagielski J., Ryba M., Mossakowski M.J. (1995) DNA protein flow cytometry of dissociated cultures of human anaplastic gliomas. Pattern of proliferation and differentiation, and the effect of a new cytostatic drug cladribine (2-CdA). *Folia Neuropathol.*, 33 (3), 145-152
77. Grieb P., Vilpo J., Kazimierczuk Z., Andrzejewska M., Kryczka T. Nowe estry nukleozydów adenozytowych i kwasu karboksylowego. Zgłoszenie patentowe nr PL368093 dokonane 18 maja 2004r.
78. Griffig J., Koob R., Blakley R.L. (1989) Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. *Cancer Res.*, 49 (24 Pt 1), 6923-6928
79. Hammel M., Laggner P., Prassl R. (2003) Structural characterisation of nucleoside loaded low density lipoprotein as a main criterion for the applicability as drug delivery system. *Chem. Phys. Lipids*, 123 (2), 193-207

80. Haramaki N., Han D., Handelman G.J., Tritschler H.J., Packer L. (1997) Cytosolic and mitochondrial systems for NADH- and NADPH-dependent reduction of α -lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (3), 535-542
81. Harris J.M., Chess R.B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2 (3), 214-221
82. Hassan R., Gupta M., Kern W., Ozer H. (2004) Acute myeloid leukemia following treatment with cladribine for hairy cell leukemia: a case report and review of the literature. *Leuk. Lymphoma*, 45 (10), 2149-2152
83. Hatse S., De Clercq E., Balzarini J. (1999) Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, 58 (4), 539-555
84. Hentosh P., Koob R., Blakley R.L. (1990) Incorporation of 2-halogeno-2'-deoxyadenosine 5-triphosphates into DNA during replication by human polymerases α and β . *J. Biol. Chem.*, 265 (7), 4033-4040
85. Hoffman M., Xu J.C., Lesser M., Rai K. (1999) Cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine, 2-cdA) in combination with other chemotherapy drugs against two lymphoma cell lines. *Leuk. Lymphoma*, 33 (1-2), 141-145
86. Holland J.F., Frei E. *Cancer Medicine* ed. 5, B.C. Decker Inc., Hamilton, 2000
87. Holowiecki J., Grosicki S., Robak T., Kyrzcz-Krzemien S., Giebel S., Hellmann A., Skotnicki A., Jedrzejczak W.W., Konopka L., Kuliczkowski K., Zdziarska B., Dmoszynska A., Marianska B., Pluta A., Zawilska K., Komarnicki M., Kloczko J., Sulek K., Haus O., Stella-Holowiecka B., Baran W., Jakubas B., Paluszewska M., Wierzbowska A., Kielbinski M., Jagoda K. (2004) Addition of cladribine to daunorubicin and cytarabine increases complete remission rate after a single course of induction treatment in acute myeloid leukemia. Multicenter, phase III study. *Leukemia*, 18 (5), 989-997
88. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity. IARC, Lyon, France, 1987
89. Iglesias-Guerra F., Candela J.I., Bautista J., Alcludia F., Vega-Perez J.M. (1999) Alkylating agents from sugars. Alkyl hexopyranoside derivatives as carrier systems for chlorambucil. *Carbohydr. Res.*, 316 (1-4), 71-84
90. Imai T., Yoshigae Y., Hosokawa M., Chiba K., Otagiri M. (2003) Evidence for the involvement of a pulmonary first-pass effect via carboxylesterase in the disposition of a propranolol ester derivative after intravenous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307 (3), 1234-1242
91. Jedlinski Z., Kurcok P., Adamus G., Juzwa M. (2000) Biomimetic polyesters and their role in ion transport across cell membranes. *Acta Biochim. Pol.*, 47 (1), 79-85
92. Jia Z., Zhang H., Huang J. (2003) Synthesis of poly(ethylene glycol) with sulfadiazine and chlorambucil end groups and investigation of its antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (15), 2531-2534
93. Jin G.Z., You Y.J., Kim Y., Nam N.H., Ahn B.Z. (2001) Esters of chlorambucil with 2-substituted 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinones as multifunctional anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 36 (4), 361-366
94. Johnson S.A. (2001) Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 2 (6), 929-943
95. Juliusson G., Høglund M., Karlsson K., Lofgren C., Mollgard L., Paul C., Tidfeldt U., Björkholm M. (2003) Increased remissions from one course for intermediate-dose cytosine arabinoside

- and idarubicin in elderly acute myeloid leukaemia when combined with cladribine. A randomized population-based phase II study. *Br. J. Haematol.*, 123 (5), 810-818
96. Kashiwaya Y., Takeshima T., Mori N., Nakashima K., Clarke K., Veech R.L. (2000) D- β -hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (10), 5440-5444
97. Kataria Y.P. (1980) Chlorambucil in sarcoidosis. *Chest*, 78(1), 36-43
98. Kawasaki H., Carrera C.J., Piro L.D., Saven A., Kipps T.J., Carson D.A. (1993) Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood*, 81 (3), 597-601
99. Koosha F., Muller R.H., Davis S.S. (1989) Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6 (2), 117-130
100. Kratz F., Beyer U., Roth T., Schutte M.T., Unold A., Fiebig H.H., Unger C. (1998) Albumin conjugates of the anticancer drug chlorambucil: synthesis, characterization, and in vitro efficacy. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 331 (2), 47-53
101. Laurencet F.M., Zulian G.B., Guetty-Alberto M., Iten P.A., Betticher D.C., Alberto P. (1999) Cladribine with cyclophosphamide and prednisone in the management of low-grade lymphoproliferative malignancies. *Br. J. Cancer*, 79 (7-8), 1215-1219
102. Lech-Maranda E., Korycka A., Robak T. (2000) Influence of gemcitabine (2',2'-difluoro-deoxycytidine) and 2-chlorodeoxyadenosine on growth of normal and leukemic cells in vitro. *Eur. J. Haematol.*, 65 (5), 317-321
103. Li C., Price J.E., Milas L., Hunter N.R., Ke S., Yu D.F., Charnsangavej C., Wallace S. (1999) Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin. Cancer Res.*, 5 (4), 891-897
104. Liliemark J. (1997) The clinical pharmacokinetics of cladribine. *Clin. Pharmacokinet.*, 32 (2), 120-131
105. Liliemark J., Juliusson G. (1995) Cellular pharmacokinetics of 2-chloro-2'-deoxyadenosine nucleotides: comparison of intermittent and continuous intravenous infusion and subcutaneous and oral administration in leukemia patients. *Clin. Cancer Res.*, 1 (4), 385-390
106. Lundberg B. (1987) Preparation of drug-low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res.*, 47 (15), 4105-4108
107. Madison L.L., Huisman G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 (1), 21-53
108. Maeda H., Seymour L.W., Miyamoto Y. (1992) Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconj. Chem.*, 3 (5), 351-362
109. Maletinska L., Blakely E.A., Bjornstad K.A., Deen D.F., Knoff L.J., Forte T.M. (2000) Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res.*, 60 (8), 2300-2303
110. Manfredini S., Baraldi P.G., Bazzanini R., Bortolotti F., Vertuani S., Ashida N., Machida H. (1998) Enzymatic synthesis of 2'-O-acyl prodrugs of 1-(β -D-ribofuranosyl)-5(E)-(2-bromovinyl)uracil and of 2'-O-acyl-araU, -araC and -araA. *Antivir. Chem. Chemother.*, 9 (1), 25-31
111. Mantovani G., Maccio A., Melis G., Mura L., Massa E., Mudu M.C. (2000) Restoration of functional defects in peripheral blood mononuclear cells isolated from cancer patients by thiol antioxidants α -lipoic acid and N-acetyl cysteine. *Int. J. Cancer*, 86 (6), 842-847

112. Marquet A., Bui B.T., Florentin D. (2001) Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam. Horm.*, 61 (1), 51-101
113. Masquelier M., Lundberg B., Peterson C., Vitols S. (2005) Cytotoxic effect of a lipophilic alkylating agent after incorporation into low density lipoprotein or emulsions: Studies in human leukemic cells. *Leuk. Res.*, *in press*
114. McLean A., Newell D., Baker G., Connors T. (1980) The metabolism of chlorambucil. *Biochem. Pharmacol.*, 29 (14), 2039-2047
115. Meier C. (1998) Pro-nucleotides - Recent advances in the design of efficient tools for the delivery of biologically active nucleoside monophosphates. *Synlett*, 3, 233-242; publikacja internetowa, <http://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/synlett/doi/10.1055/s-1998-1637>. Strona wizytowana 15.08.2005r.
116. Moini H., Packer L., Saris N.E. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182 (1), 84-90
117. Moller T.R., Brandt L., Konyves I., Lindberg G. (1975) Therapeutic effect of Leo 1031, an alkylating corticosteroid ester; in lymphoproliferative disorders. II. Lymphocytic lymphoma. *Acta Med. Scand.*, 197 (4), 323-327
118. Montillo M., Tedeschi A., O'Brien S., Di Raimondo F., Lerner S., Ferrajoli A., Morra E., Keating M.J. (2003) Phase II study of cladribine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia. *Cancer*, 97 (1), 114-120
119. Muirhead N. (1999) Management of idiopathic membranous nephropathy: evidence-based recommendations. *Kidney Int. Suppl*, 70 (Suppl.), S47-S55
120. Odenike O.M., Sobecks R.M., Janisch L., Huo D., Zimmerman T.M., Daugherty C.K., Ratain M.J., Larson R.A. (2004) A phase I trial of gemcitabine plus cladribine in patients with advanced hematologic malignant diseases. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54 (6), 553-561
121. Ouchi T., Banba T., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M. (1990) Synthesis and antitumor activity of conjugates of 5-fluorouracil and chito-oligosaccharides involving a hexamethylene spacer group and carbamoyl bonds. *Drug Des Deliv.*, 6 (4), 281-287
122. Pack R.A., Hardy K., Madigan M.C., Hunt N.H. (2002) Differential effects of the antioxidant α -lipoic acid on the proliferation of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes and leukaemic T cells. *Mol. Immunol.*, 38 (10), 733-745
123. Packer L., Kraemer K., Rimbach G. (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17 (10), 888-895
124. Pangalis G.A., Vassilakopoulos T.P., Dimopoulou M.N., Siakantaris M.P., Kontopidou F.N., Angelopoulou M.K. (2002) B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol. Oncol.*, 20 (3), 103-146
125. Parang K., Knaus E.E., Wiebe L.I. (1998) Synthesis, in vitro anti-HIV activity, and biological stability of 5'-O-myristoyl analogue derivatives of 3'-fluoro-2',3'-dideoxythymidine (FLT) as potential bifunctional prodrugs of FLT. *Nucleosides Nucleotides*, 17 (6), 987-1008
126. Parang K., Wiebe L.I., Knaus E.E. (2000) Novel approaches for designing 5'-O-ester prodrugs of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT). *Curr. Med. Chem.*, 7 (10), 995-1039
127. Pardnani A., Hoffbrand A.V., Butterfield J.H., Tefferi A. (2004) Treatment of systemic mast cell disease with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leuk. Res.*, 28 (2), 127-131

128. Parker W.B., Bapat A.R., Shen J.X., Townsend A.J., Cheng Y.C. (1988) Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase. *Mol. Pharmacol.*, 34 (4), 485-491
129. Persson H.L., Svensson A.I., Brunk U.T. (2001) α -lipoic acid and α -lipoamide prevent oxidant-induced lysosomal rupture and apoptosis. *Redox. Rep.*, 6 (5), 327-334
130. Pick U., Haramaki N., Constantinescu A., Handelman G.J., Tritschler H.J., Packer L. (1995) Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for α -lipoic acid enantiomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206 (2), 724-730
131. Piddubnyak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Glowala M., Fiszer-Kierzkowska A., Jedlinski Z., Juzwa M., Krawczyk Z. (2004) Oligo-3-hydroxybutyrates as potential carriers for drug delivery. *Biomaterials*, 25 (22), 5271-5279
132. Prentice H.G., Russell N.H., Lee N., Ganeshaguru K., Blacklock H., Piga A., Smyth J.F., Hoffbrand A.V. (1981) Therapeutic selectivity of and predication of response to 2'-deoxycoformycin in acute leukaemia. *Lancet*, 2 (8258), 1250-1254
133. Rajkumar S.V., Burch P.A., Nair S., Dinapoli R.P., Scheithauer B., O'Fallon J.R., Etzell P.S., Leitch J.M., Morton R.F., Marks R.S. (1999) Phase II North Central Cancer Treatment Group study of 2-chlorodeoxyadenosine in patients with recurrent glioma. *Am. J. Clin. Oncol.*, 22 (2), 168-171
134. Rao H.S.P. (2003) Capping drugs: development of prodrugs. *Resonance*, 19-27; publikacja internetowa, <http://www.ias.ac.in/resonance/Feb2003/pdf/Feb2003p19-27.pdf>. Strona wizytowana 15.08.2005r.
135. Reichard P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 57 (2), 349-374
136. Reusch R.N. (1995) Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Can. J. Microbiol.*, 41 (Suppl 1), 50-54
137. Reusch R.N., Huang R., Kosk-Kosicka D. (1997) Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump. *FEBS Lett.*, 412 (3), 592-596
138. Reusch R.N., Sparrow A.W., Gardiner J. (1992) Transport of poly- β -hydroxybutyrate in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1123 (1), 33-40
139. Robak E., Robak T., Biernat W., Bartkowiak J., Krykowski E. (2002) Successful treatment of leukaemia cutis with cladribine in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Dermatol.*, 147 (4), 775-780
140. Robak T. (2001) Cladribine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 40 (5-6), 551-564
141. Robak T. (2003) Purine nucleoside analogues in the treatment of myeloid leukemias. *Leuk. Lymphoma*, 44 (3), 391-409
142. Robak T., Blasinska-Morawiec M., Blonski J., Hellmann A., Halaburda K., Konopka L., Kotlarek-Haus S., Potoczek S., Hansz J., Dmoszynska A., Urasinski I., Zdziarska B., Dwilewicz-Trojaczek J., Holowiecki J., Skotnicki A.B. (1999) 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine) in the treatment of hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant: 7-year experience in Poland. *Eur. J. Haematol.*, 62 (1), 49-56
143. Robak T., Blonski J.Z., Gora-Tybor J., Kasznicki M., Konopka L., Ceglarek B., Komarnicki M., Lewandowski K., Hellmann A., Lewandowski K., Moskwa A., Dmoszynska A., Sokolowska B., Dwilewicz-Trojaczek A., Tomaszewska A., Sulek K., Calbecka M. (2004) Second

malignancies and Richter's syndrome in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with cladribine. *Eur. J. Cancer*, 40 (3), 383-389

144. Robak T., Blonski J.Z., Kasznicki M., Gora-Tybor I., Dwilewicz-Trojaczek J., Boguradzki P., Konopka L., Ceglarek B., Sulek J., Kuliczowski K., Wolowiec D., Stella-Holowiecka B., Skotnicki A.B., Nowak W., Moskwa-Sroka B., Dmoszynska A., Calbecka M. (2001) Cladribine combined with cyclophosphamide and mitoxantrone as front-line therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 15 (10), 1510-1516
145. Robak T., Blonski J.Z., Kasznicki M., Gora-Tybor J., Dwilewicz-Trojaczek J., Stella-Holowiecka B., Wolowiec D. (2002) Cladribine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. J.*, 3 (5), 244-250
146. Robak T., Blonski J.Z., Kasznicki M., Konopka L., Ceglarek B., Dmoszynska A., Soroka-Wojtaszko M., Skotnicki A.B., Nowak W., Dwilewicz-Trojaczek J., Tomaszewska A., Hellmann A., Lewandowski K., Kuliczowski K., Potoczek S., Zdziarska B., Hansz J., Kroll R., Komarnicki M., Holowiecki J., Grieb P. (2000) Cladribine with or without prednisone in the treatment of previously treated and untreated B-cell chronic lymphocytic leukaemia - updated results of the multicentre study of 378 patients. *Br. J. Haematol.*, 108 (2), 357-368
147. Robak T., Blonski J.Z., Kasznicki M., Gora-Tybor J., Hellmann A., Konopka L., Dmoszynska A., Dwilewicz-Trojaczek J., Wolowiec D. (2002) Re-treatment with cladribine-based regimens in relapsed patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Efficacy and toxicity in comparison with previous treatment. *Eur. J. Haematol.*, 69 (1), 27-36
148. Robak T., Gora-Tybor J. (2001) Cladribine combined with mitoxantrone in the treatment of blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Neoplasma*, 48 (3), 203-207
149. Robak T., Kordek R., Robak E., Bartkowiak J., Biernat W., Liberski P., Blonski J. (2002) Langerhans cell histiocytosis in a patient with systemic lupus erythematosus: a clonal disease responding to treatment with cladribine, and cyclophosphamide. *Leuk. Lymphoma*, 43 (10), 2041-2046
150. Roberts E.L., Newton R.P., Axford A.T. (2004) Plasma purine nucleoside phosphorylase in cancer patients. *Clin. Chim. Acta*, 344 (1-2), 109-114
151. Rubnitz J.E., Razzouk B.I., Srivastava D.K., Pui C.H., Ribeiro R.C., Santana V.M. (2004) Phase II trial of cladribine and cytarabine in relapsed or refractory myeloid malignancies. *Leuk. Res.*, 28 (4), 349-352
152. Rummel M.J., Chow K.U., Jager E., Leimer L., Hossfeld D.K., Bergmann L., Peters H.D., Hansmann M.L., Meyer A., Hoelzer D., Mitrou P.S. (1999) Intermittent 2-hour-infusion of cladribine as first-line therapy or in first relapse of progressive advanced low-grade and mantle cell lymphomas. *Leuk. Lymphoma*, 35 (1-2), 129-138
153. Rummel M.J., Chow K.U., Karakas T., Jager E., Mezger J., von Grunhagen U., Schalk K.P., Burkhard O., Hansmann M.L., Ritzel H., Bergmann L., Hoelzer D., Mitrou P.S. (2002) Reduced-dose cladribine (2-CdA) plus mitoxantrone is effective in the treatment of mantle-cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Cancer*, 38 (13), 1739-1746
154. Saboulard D., Naesens L., Cahard D., Salgado A., Pathirana R., Velazquez S., McGuigan C., De Clercq E., Balzarini J. (1999) Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine. *Mol. Pharmacol.*, 56 (4), 693-704
155. Samonis G., Kontoyiannis D.P. (2001) Infectious complications of purine analog therapy. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 14 (4), 409-413

156. Satoh T., Taylor P., Bosron W.F., Sanghani S.P., Hosokawa M., La Du B.N. (2002) Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab Dispos.*, 30 (5), 488-493
157. Saven A., Lee T., Kosty M., Piro L. (1996) Cladribine and mitoxantrone dose escalation in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 14 (7), 2139-2144
158. Savolainen H.A. (1999) Chlorambucil in severe juvenile chronic arthritis: longterm followup with special reference to amyloidosis. *J. Rheumatol.*, 26 (4), 898-903
159. Scherer T.M., Fuller R.C., Goodwin S., Lenz R.W. (2000) Enzymatic hydrolysis of oligomeric models of poly-3-hydroxybutyrate. *Biomacromolecules.*, 1 (4), 577-583
160. Schiavon O., Pasut G., Moro S., Orsolini P., Guiotto A., Veronese F.M. (2004) PEG-Ara-C conjugates for controlled release. *Eur. J. Med. Chem.*, 39 (2), 123-133
161. Schupke H., Hempel R., Peter G., Hermann R., Wessel K., Engel J., Kronbach T. (2001) New metabolic pathways of α -lipoic acid. *Drug Metab Dispos.*, 29 (6), 855-862
162. Sen C.K., Roy S., Han D., Packer L. (1997) Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by α -lipoic acid: a flow cytometric analysis. *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (7), 1241-1257
163. Sheh L., Chang H.W., Ong C.W., Chen S.L., Bailly C., Linszen R.C., Waring M.J. (1995) Synthesis, DNA binding, and sequence specificity of DNA alkylation by some novel cyclic peptide-chlorambucil conjugates. *Anticancer Drug Des*, 10 (5), 373-388
164. Smyth M.J., Pietersz G.A., Classon B.J., McKenzie I.F. (1986) Specific targeting of chlorambucil to tumors with the use of monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76 (3), 503-510
165. Smyth M.J., Pietersz G.A., McKenzie I.F. (1986) Potentiation of the in vitro cytotoxicity of chlorambucil by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 137 (10), 3361-3366
166. Spasokoukotskaja T., Arner E.S., Brosjo O., Gunven P., Juliusson G., Liliemark J., Eriksson S. (1995) Expression of deoxycytidine kinase and phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine in human normal and tumour cells and tissues. *Eur. J. Cancer*, 31A (2), 202-208
167. Szmigielska-Kaplon A., Smolewski P., Najder M., Robak T. (2002) Evaluation of apoptosis induced in vitro by cladribine (2-CdA) combined with anthracyclines in lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Hematol.*, 81 (9), 508-513
168. Tefferi A., Levitt R., Li C.Y., Schroeder G., Tschetter L.K., Michalak J.C., Krook J.E., Witzig T.E. (1999) Phase II study of 2-chlorodeoxyadenosine in combination with chlorambucil in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Oncol.*, 22 (5), 509-516
169. Tefferi A., Li C.Y., Reeder C.B., Geyer S.M., Allmer C., Levitt R., Michalak J.C., Addo F., Krook J.E., Witzig T.E., Schaefer P.L., Mailliard J.A. (2001) A phase II study of sequential combination chemotherapy with cyclophosphamide, prednisone, and 2-chlorodeoxyadenosine in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 15 (8), 1171-1175
170. Terasaka T., Nakanishi I., Nakamura K., Eikyu Y., Kinoshita T., Nishio N., Sato A., Kuno M., Seki N., Sakane K. (2003) Structure-based de novo design of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (6), 1115-1118
171. Tieu K., Perier C., Caspersen C., Teismann P., Wu D.C., Yan S.D., Naini A., Vila M., Jackson-Lewis V., Ramasamy R., Przedborski S. (2003) D- β -hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.*, 112 (6), 892-901

172. Tobias S.C., Borch R.F. (2001) Synthesis and biological studies of novel nucleoside phosphoramidate prodrugs. *J. Med. Chem.*, 44 (25), 4475-4480
173. Towu E., Al Mufti R., Spitz L., Marron K., Winslet M. (2002) Uptake of Lipiodol--cytotoxic conjugates by hepatoblastoma cells. *Br. J. Surg.*, 89 (4), 437-441
174. Trinchet J.C., Ganne-Carrie N., Beaugrand M. (2003) Review article: intra-arterial treatments in patients with hepatocellular carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 17 (Suppl 2), 111-118
175. Tripathi P.K., Khopade A.J., Nagaich S., Shrivastava S., Jain S., Jain N.K. (2002) Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil. *Pharmazie*, 57 (4), 261-264
176. Tung E., Goust J.M., Chen W.Y., Kang S.S., Wang I.Y., Wang A.C. (1983) Cytotoxic effect of anti-idiotypic antibody-chlorambucil conjugates against human lymphoblastoid cells. *Immunology*, 50 (1), 57-64
177. Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M. (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.*, 99 (11), 3181-3198
178. Van de Mark K., Chen J.S., Steliou K., Perrine S.P., Faller D.V. (2003) α -lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J. Cell Physiol*, 194 (3), 325-340
179. Van den Neste E., Delannoy A., Feremans W., Ferrant A., Michaux L. (2001) Second primary tumors and immune phenomena after fludarabine or 2-chloro-2'-deoxyadenosine treatment. *Leuk. Lymphoma*, 40 (5-6), 541-550
180. Van den Neste E., Martiat P., Mineur P., Delannoy A., Doyen C., Zenebergh A., Michaux J.L., Ferrant A. (1998) 2-Chlorodeoxyadenosine with or without daunorubicin in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.*, 76 (1), 19-23
181. Van den Neste E., Michaux L., Layios N., Costantini S., Francart J., Lambert C., Sonet A., Andre M., Robert A., Ferrant A. (2004) High incidence of complications after 2-chloro-2'-deoxyadenosine combined with cyclophosphamide in patients with advanced lymphoproliferative malignancies. *Ann. Hematol.*, 83 (6), 356-363
182. Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. (2003) Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.*, 100 (2), 119-139
183. Veronese F.M., Morpurgo M. (1999) Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *Farmaco*, 54 (8), 497-516
184. Verschoyle R.D., Carthew P., Holley J.L., Cullis P., Cohen G.M. (1994) The comparative toxicity of chlorambucil and chlorambucil-spermidine conjugate to BALB/c mice. *Cancer Lett.*, 85 (2), 217-222
185. Versluis A.J., Rump E.T., Rensen P.C., van Berkel T.J., Bijsterbosch M.K. (1998) Synthesis of a lipophilic daunorubicin derivative and its incorporation into lipidic carriers developed for LDL receptor-mediated tumor therapy. *Pharm. Res.*, 15 (4), 531-537
186. Vitols S. (1991) Uptake of low-density lipoprotein by malignant cells--possible therapeutic applications. *Cancer Cells*, 3 (12), 488-495
187. Wang L., Karlsson A., Arner E.S., Eriksson S. (1993) Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. Efficient phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine. *J. Biol. Chem.*, 268 (30), 22847-22852

188. Warzocha K., Fabianowska-Majewska K., Blonski J., Krykowski E., Robak T. (1997) 2-Chlorodeoxyadenosine inhibits activity of adenosine deaminase and S-adenosylhomocysteine hydrolase in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Eur. J. Cancer*, 33 (1), 170-173
189. Watson J.D. (2004) *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings, San Francisco
190. Weller P.F., Bublej G.J. (1994) The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*, 83 (10), 2759-2779
191. Williams W., Craver R.D., Correa H., Velez M., Gardner R.V. (2002) Use of 2-chlorodeoxyadenosine to treat infantile myofibromatosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 24 (1), 59-63
192. Wittman M.D., Kadow J.F., Vyas D.M., Lee F.L., Rose W.C., Long B.H., Fairchild C., Johnston K. (2001) Synthesis and antitumor activity of novel paclitaxel-chlorambucil hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11 (6), 811-814
193. Wright R.A., O'Duffy J.D., Rodriguez M. (1999) Improvement of myelopathy in Sjogren's syndrome with chlorambucil and prednisone therapy. *Neurology*, 52 (2), 386-388
194. Xia Z., Wiebe L.I., Miller G.G., Knaus E.E. (1999) Synthesis and biological evaluation of butanoate, retinoate, and bis(2,2,2-trichloroethyl)phosphate derivatives of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 2',5-difluoro-2'-deoxyuridine as potential dual action anticancer prodrugs. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 332 (8), 286-294
195. Zakład Badań Toksykologicznych Instytutu Przemysłu Organicznego oddział w Pszczynie. (2003) Badanie toksyczności ostrej dootrzewnowej na myszach. Kod badania: OS-50/02 i OS-51/02. Raport IPO /o. Pszczyna, 1-12
196. Zhivkova Z., Stankova I. (2000) Stability of some novel thymidine, 5-bromo-2'-deoxyuridine and 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine analogues. *Int. J. Pharm.*, 200 (2), 181-185

8. STRESZCZENIE

2'-Deoksyadenozyna (dA) jest naturalnym nukleozydem dostarczonym do wnętrza komórek przez białkowe transportery nukleozydowe. Wewnątrz komórek dA podlega fosforylacji przez kinazę deoksycytydynową (dCK), bądź dezaminacji katalizowanej przez dezaminazę adenozynową (ADA). 2-Chloro-2'-deoksyadenozyna (2CdA, kladrybina), analog dA zawierający w pozycji 2 pierścienia purynowego atom chloru zamiast atomu wodoru, ulega fosforylacji podobnie jak dA, lecz jest oporna na dezaminację. Szczególnie wysoka aktywność dCK w limfocytach sprawia, że związek ten jest wybiórczo gromadzony w komórkach limfoidalnych i jest wobec nich toksyczny. Dzięki temu 2CdA znalazła zastosowanie w medycynie jako lek przeciwbiałczkowy oraz immunosupresyjny.

Niniejsza rozprawa dotyczy niektórych fizykochemicznych i biologicznych właściwości przykładowych 5'-O-estrów dA i 2CdA z kwasami karboksylowymi. Badano zsyntetyzowane przez zespół prof. Z. Kazimierczuka (SGGW, Warszawa) estry tych nukleozydów z chlorambucylem (CLB), który jest środkiem alkilującym stosowanym jako lek pierwszego rzutu w przewlekłej białczce limfatycznej, oraz kwasem (R,S)- α -liponowym (LA), który wg danych literaturowych wykazywał w milimolarnych stężeniach wybiórcze właściwości przeciwbiałczkowe. Ponadto badano dwa preparaty (określane skrótami AK1 i AK2) zawierające estry 2CdA z krótkołańcuchowymi polimerami kwasu (R,S)- β -hydroksymasłowego (PHB), zsyntetyzowane przez zespół prof. Z. Jedlińskiego (Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrze).

Przesłanką badań była hipoteza, że jeśli estry dA i 2CdA będą podatne na działanie wewnątrzkomórkowych esteraz, to fosforylacja uwolnionej wewnątrz komórek 2CdA lub dezaminacja uwolnionej wewnątrz komórek dA uczyni te estry bardziej limfocytotoksycznymi od substancji macierzystych. Celem badań było: a) scharakteryzowanie stabilności estrów w roztworach wodnych i ich podatności na enzymatyczną hydrolizę; b) stwierdzenie, czy estry te wchodzą do komórek, a uwalniane z nich nukleozydy ulegają wewnątrzkomórkowej akumulacji (2CdA) bądź degradacji (dA); c) porównanie toksyczności estrów i ich substancji macierzystych wobec komórek ludzkich linii białczkowych. Uzyskane wyniki miały posłużyć do selekcji badanych preparatów z punktu widzenia celowości dalszego ich rozwijania jako leków przeciwnowotworowych.

Badania czystości, stabilności i podatności na enzymatyczną hydrolizę wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stwierdzono, że 5'-O-estry nukleozydów z CLB i LA nie zawierają mierzalnych zanieczyszczeń, a preparaty AK1 i AK2 są zanieczyszczone niezwiązaną 2CdA w ilości odpowiednio $0,9 \pm 0,05\%$ i $1,9 \pm 0,06\%$ całkowitej zawartości 2CdA w tych preparatach (średnia \pm SD, n=4). Stwierdzono

ponadto, że preparaty AK1 i AK2 nie są substancjami jednorodnymi, lecz mieszaninami wielu chromatograficznie rozróżnialnych składników różniących się prawdopodobnie liczbą merów w łańcuchach PHB dołączonych do nukleozydu.

Wszystkie 5'-O-estry okazały się stabilne w środowisku wodnym o pH 7,4 i temp. 37°C, nie zawierającym esteraz oraz podatne na enzymatyczną hydrolizę przez esterazę wątrobową. Najszybciej hydrolizowały estry dA i 2CdA z LA, a najwolniej – AK1 i AK2. Obserwowane podczas hydrolizy preparatów AK1 i AK2 zmiany składu tych mieszanin wskazują, że esterazy powodowały stopniowe skracanie łańcuchów PHB.

Badania hydrolizy estrów przez osocze krwi i lizat komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (KJKO) miały na celu ustalenie kinetyki degradacji tych związków w warunkach przypominających środowisko krwi człowieka. Okazało się, że najszybciej hydrolizowały w obecności esteraz osocza krwi 5'-O-estry dA i 2CdA z LA, a najwolniej – AK1 i AK2. W przypadku 5'-O- estrów dA i 2CdA z CLB reakcje te po 2 godzinach ulegały dramatycznemu spowolnieniu, a średni udział niezestryfikowanego nukleozydu w mieszaninach reakcyjnych nie przekraczał 55% (2CdA) i 45% (dA).

Badania kinetyki wchodzenia estrów do komórek *in vitro* wykonano metodami radioizotopowymi na komórkach ostrej białaczki promielocytowej HL60, ostrej białaczki T-komórkowej limfoblastycznej MOLT4 i KJKO. Ponieważ badane estry nie były dostępne w formach znakowanych radioaktywnie i ich wychwyty przez komórki nie mógł być badany bezpośrednio, zaprojektowano doświadczenia, w których użyto radionukleozydy [8-¹⁴C]dA i [8-¹⁴C]2CdA.

Na podstawie kinetyk wychwyty [8-¹⁴C]2CdA przez komórki normalne i nowotworowe ustalono, że tempo akumulacji radionukleozydu jest najintensywniejsze w ciągu pierwszych 45 minut ekspozycji komórek na ten związek. W związku z powyższym czas inkubacji komórek z estrami, ich substancjami macierzystymi i radionukleozydami w kolejnych doświadczeniach radioizotopowych nie przekraczał 40 minut. Porównano wpływ preinkubacji komórek z 5'-O- estrem dA z CLB, związkami macierzystymi tego estru lub mieszaniną tych związków na wychwyty [8-¹⁴C]dA. Okazało się, że preinkubacja komórek MOLT4 z tym estrem istotnie zmniejszała, w porównaniu do związków macierzystych, wychwyty radionukleozydu. Takiego efektu nie zaobserwowano w eksperymentach z komórkami HL60.

W kolejnym eksperymencie komórki współinkubowano z mieszaninami radionukleozydu i nukleozydu nieradioaktywnego lub 5'-O-estrami dA lub 2CdA z CLB. Zaobserwowano, że wychwyty [8-¹⁴C]dA i [8-¹⁴C]2CdA przez komórki HL60 i KJKO był hamowany w podobnym stopniu przez ester jak i jego odpowiedni nieradioaktywny nukleozyd. W przypadku komórek MOLT4 wychwyty [8-¹⁴C]dA był hamowany istotnie silniej przez 5'-O-ester dA z CLB, niż przez dA. Podobną tendencję zaobserwowano

także w przypadku wychwytu [$8\text{-}^{14}\text{C}$]2CdA przez te komórki współinkubowane z 5'-O-estrem 2CdA z CLB. Powyższe wyniki wykazują, że tempo wychwytu 5'-O-estrów dA i 2CdA z CLB przez komórki jest znacząco większe niż nukleozydów macierzystych, co prawdopodobnie jest skutkiem intensywnej wewnątrzkomórkowej hydrolizy tych związków.

Dla porównania cytotoksyczności estrów i ich substancji macierzystych, komórki ludzkich białaczek (HL60, MOLT4 i przewlekłej białaczki szpikowej K562) inkubowano z różnymi stężeniami badanych substancji przez 48 i 96 godzin i mierzono przeżywalność komórek przy pomocy testu MTT. Na podstawie wyznaczonych wartości IC_{50} stwierdzono, że jedynie 5'-O-ester dA z CLB był bardziej aktywny przeciwnowotworowo od macierzystego cytostatyku, tj. CLB. Jego toksyczność wobec komórek HL60 była ok. 2 – 6-krotnie większa od niezestryfikowanego CLB, 3,5 – 4-krotnie większa wobec komórek MOLT4 i 2,5-krotnie większa wobec komórek K562. Pozostałe estry okazały się mniej cytotoksyczne od substancji macierzystych, a ester dA-LA nie wykazał żadnych właściwości przeciwnowotworowych w testowanym zakresie stężeń.

Na podstawie prezentowanych wyników badań przyjąć należy, że jedyną substancją, która ewentualnie rokuje nadzieje na praktyczne zastosowanie w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego jest 5'-O-ester dA z CLB.