

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Danuta Drozdowska (do 18.02.2006 Bartulewicz)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

a) magister chemii, Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku, 1989.

b) doktor nauk farmaceutycznych, Akademia Medyczna, Lublin, 1999.

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych:

a) 1.09.1989 – 31.08.1990 – asystent stażysta, Zakład Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Białymstoku;

b) 1.09.1990 – 30.06.1999 – asystent, Zakład Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Białymstoku;;

c) 1.07.1999 – 22.03.2008 – adiunkt, Zakład Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Białymstoku;

d) od 22.03.2008 – adiunkt, Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

4. Znaczące osiągnięcia naukowe

Materiałem źródłowym opisu moich znaczących osiągnięć naukowych, będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, są następujące prace:

I. **Drozdowska Danuta**, Rusak Małgorzata, Bielawski Tomasz, Midura-Nowaczek Krystyna, Analogues of distamycin — synthesis and biological evaluation of new aromatic oligopeptides, potential anticancer agents, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 66 (2009) 633-638 (IF = 0.347; pkt MNiSW = 13).

Wkład pracy kandydata: 50 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników I przygotowanie pracy do druku.

II. **Drozdowska Danuta**, Rusak Małgorzata, Miltyk Wojciech, Midura-Nowaczek Krystyna, Synthesis and Biological Evaluation of Distamycin Analogues – New Potential Anticancer Agents, *Archiv der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences*, 342 (2009) 87-93 (IF = 1.785; pkt MNiSW = 27).

Wkład pracy kandydata: 50 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników I przygotowanie pracy do druku.

III. **Bartulewicz Danuta.**, Anchim Tomasz, Dąbrowska Milena, Midura-Nowaczek Krystyna, Synthesis and cytotoxic effect of carbocyclic potential minor groove binders, *Il Farmaco* 59 (2004) 211-214 (pkt MNiSW = 6).

Wkład pracy kandydata: 60 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników I przygotowanie pracy do druku.

IV. **Drozdowska Danuta**, Rusak Małgorzata, Bielawski Tomasz, Midura-Nowaczek Krystyna, Carbocyclic potential DNA minor groove binders and their biological evaluation, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 25 (2010) 629-634 (IF = 1.574; pkt MNiSW = 27).

Wkład pracy kandydata: 50 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku.

V. Pućkowska Anna, **Drozdowska Danuta**, Midura-Nowaczek Krystyna, Carbocyclic analogues of lexitropsin - DNA affinity and endonuclease inhibition. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.*, 64 (2007) 115-119 (pkt MNiSW = 9).

Wkład pracy kandydata: 30 %, częściowe opracowanie koncepcji pracy, wykonanie i opracowanie części wyników, współdział w przygotowaniu pracy do druku.

VI. **Bartulewicz Danuta**, Aromatic oligopeptides with chlorambucil moiety – synthesis and biological evaluation, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.*, 62 (2005) 451-455 (pkt MNiSW = 6).

Wkład pracy kandydata: 100 %, przygotowanie koncepcji pracy, wykonanie i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

VII. **Drozdowska Danuta**, New solid phase synthesis of distamycin analogues, *Molecules*, 16 (2011) 3066-76 (IF = 1.988 za 2010 rok; pkt MNiSW = 20).

Wkład pracy kandydata: 100 %, przygotowanie koncepcji pracy, wykonanie i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

VIII. **Drozdowska Danuta**, Szerszenowicz Jakub, Semi-Automatic Synthesis of Distamycin Analogues and Their DNA-Binding Properties, *Letters in Drug Design & Discovery*, 9 (2012) 12-16 (IF = 0.668 za 2010 rok; pkt MNiSW = 13).

Wkład pracy kandydata: 80 %, przygotowanie koncepcji pracy, współwykonanie i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

Pracę badawczą zawartą w wyżej wymienionych publikacjach wykonano w latach 2004–2011 w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Badania były finansowane z grantów MNiSW – ukończony 2P05F 017 27 i trwający N N405 355537 oraz prac własnych i statutowych UMB.

Wprowadzenie

Leczenie chorób nowotworowych jest jednym z głównych problemów współczesnej medycyny. Przyczyną wciąż zbyt dużej umieralności chorych cierpiących na nowotwory jest brak specyficznych i bezpiecznych leków. Poznanie molekularnych mechanizmów procesów nowotworowych umożliwia poszukiwanie substancji działających skutecznie na wybrane cele molekularne. Syntezy nowych związków chemicznych, potencjalnych środków przeciwnowotworowych to wciąż aktualny i bardzo ważny kierunek badawczy.

Za wiodący temat mojej pracy naukowej uważam syntezę i badanie zależności struktura-aktywność związków działających na procesy nowotworowe. Główny nurt prowadzonych przeze mnie badań dotyczy syntezy analogów nowoczesnej grupy związków o właściwościach przeciwnowotworowych, działających poprzez selektywne wiązanie się z węższą bruzdą B-DNA, w tym netropsyny i distamycyny oraz badania ich aktywności biologicznej.

Distamycyna (Stallimycyna) i netropsyna są naturalnymi antybiotykami o silnym działaniu przeciwnowotworowym, wyizolowanymi z *Streptomyces netropsis* i *Streptomyces distallicus*. Pod względem chemicznym związki te są oligopeptydami zbudowanymi z pierścieni metylopirolowych połączonych wiązaniami amidowymi. Fragmentem C-terminalnym każdego z antybiotyków jest grupa 2-amidynoetyloaminowa, a N-terminalnym – formylowa w przypadku distamycyny i guanidynoacetylowa w przypadku netropsyny. W warunkach fizjologicznych distamycyna jest kationem jedno-, a netropsyna dwudodatnim.

Cząsteczki tych naturalnych antybiotyków, zbudowane z reszt kwasu 4-amino-1-metylopirolo-2-karboksylowego, mają sierpowato wygięty kształt, izohelikalny z kształtem mniejszej bruzdy B-DNA. Oba związki charakteryzują się wysoką selektywnością wiązania do regionów DNA bogatych w pary A-T oraz aktywnością zarówno przeciwnowotworową, jak i przeciwwirusową. Distamycyna i netropsyna, wiążąc się silnie z B-DNA, wnikają głęboko do wnętrza mniejszej bruzdy, dzięki czemu hamują działanie polimeraz, wpływając na proces replikacji i transkrypcji. Związki te powodują zatrzymanie fazy G2 i poliploidyzację w ludzkich diploidalnych fibroblastach, hamują również aktywność topoizomerazy I oraz różnego rodzaju enzymów restrykcyjnych. Netropsyna hamuje wzrost bakterii G(+) i G(-), prątków kwasoodpornych pierwotniaków oraz namnażanie się wirusów zwierzęcych. Distamycyna hamuje syntezę wirusowego DNA *Herpes simplex*, a także wiąże się z fragmentami retrowirusa HIV-1. Obydwa antybiotyki wykazują właściwości cytotoksyczne *in vitro* i *in vivo* w stosunku do nowotworów Ehrlicha i Walkera.

Związki te z powodu zbyt dużej toksyczności nie znalazły zastosowania w praktyce klinicznej, służą jednak jako modele, wzorce i nośniki grup czynnych w poszukiwaniu nowych środków przeciwnowotworowych. Wraz z innymi związkami wiążącymi się z mniejszą bruzdą DNA stosuje się je jako sondy DNA lub stabilizatory hybrydyzacji DNA. Analogi netropsyny i distamycyny znalazły też zastosowanie jako nośniki związków o znanym działaniu przeciwnowotworowym do ściśle określonych rejonów DNA. Model oddziaływania netropsyny i distamycyny z B-DNA stał się inspiracją do poszukiwań związków posiadających podobny sposób wiązania do DNA. Klasa syntetycznych heteroaromatycznych oligopeptydów, projektowanych na ich wzór, otrzymała nazwę **leksitropsyny**. Pomimo ogromnego postępu w

projektowaniu leksitropsyn o wysoce selektywnym sposobie działania nie uzyskano dotychczas związków, których właściwości pozwoliłyby na ich zastosowanie lecznicze.

Założenia i cel naukowy

Podstawowym elementem struktury netropsyny i distamycyny są pierścienie heteroaromatyczne połączone ze sobą wiązaniami amidowymi. Przedmiotem moich badań było opracowanie nowych metod syntezy analogów, w których pierścienie N-metylopirolowe, obecne w strukturze cząsteczek distamycyny i netropsyny, zamieni się na benzenowe. W następnym etapie konieczne było określenie, jak zamiana ta wpływa na aktywność biologiczną nowych leksitropsyn.

Wykorzystując komputerowe modelowanie cząsteczkowe w programie Hyperchem pracującym w środowisku Windows, przy użyciu semiempirycznych metod mechaniki kwantowej, potwierdziłam strukturalne podobieństwo związków będących benzenowymi analogami netropsyny i distamycyny z krystalograficznymi wzorcami z bazy danych Brookhaven National Laboratory Protein Data Bank USA, a w konsekwencji teoretyczną możliwość wiązania się z węższą bruzdą B-DNA. Molekularne modelowanie kompleksów związków z dodekamerem B-DNA $d[CGCGAATTCGCG]_2$ potwierdziło też, że benzenowe analogi mogą ułożyć się w węższej bruzdzie, specyficznie wobec regionów AT. Analiza energetyczna wykazała, że w tworzeniu kompleksu karbocykliczna leksitropsyna-DNA większą rolę odgrywają siły van der Waalsa i oddziaływania elektrostatyczne niż wiązania wodorowe. Związki zawierające w swej strukturze dwa pierścienie benzenowe miały kształt bardziej izohelikalny do węższej bruzdy niż te zawierające trzy podjednostki karbocykliczne.

Modelowanie cząsteczkowe związków potwierdziło, że zarówno karbocykliczne leksitropsyny z wolną grupą aminową, jak też podstawione chlorambucylem, mogą tworzyć kompleksy z fragmentami DNA bogatymi w sekwencje par zasad AT, choć specyficzność ta jest mniejsza w porównaniu z netropsyną i distamycyną.

Projektując benzenowe pochodne N-metylopirolowych substancji wzorcowych zakładałam większą trwałość substratów i produktów, oczekiwałam też mniejszej cytotoksyczności związków karbocyklicznych w odniesieniu do substancji modelowych. Nieliczne doniesienia literaturowe dotyczące otrzymywania benzenowych pochodnych netropsyny i distamycyny nie przedstawiały uniwersalnej metody, którą można byłoby wykorzystać do syntezy bibliotek wielu związków.

W ramach przygotowania rozprawy doktorskiej, w toku kolejnych doświadczeń opracowałam dwie metody syntezy wiązań amidowych pozwalające na dobudowywanie dowolnej liczby pierścieni aromatycznych.

W pierwszej z opracowanych metod wykorzystałam grupę azową do ochrony aromatycznej grupy aminowej. Łatwo dostępnym substratem wyjściowym do dalszych syntez był kwas 4-hydroksyazobenzeno-3-karboksylowy. Związek ten, po uprzedniej estryfikacji grupy karboksylowej, poddałam aminolizie przy pomocy N,N-dimetylo-1,3-propanodiaminy. Następnie przeprowadziłam redukcję grupy azowej wodorem w obecności platyny. Otrzymaną w wyniku redukcji aminę aromatyczną poddałam reakcji acylowania za pomocą chlorku wyjściowego kwasu. W celu otrzymania kolejnych wiązań amidowych powtarzałam opisane procesy. Kończącym produktem był benzenowy analog netropsyny (2 podjednostki benzenowe) lub

distamycyny (3 podjednostki). Oba związki zawierały grupę metoksyłową w pozycji *orto* do wiązań amidowych.

W drugiej z opracowanych metod, syntezę rozpoczęłam od kondensacji łatwo dostępnego chlorku 3-nitrobenzoilu z N,N-dimetylo-1,3-propanodiaminą. Następnie przeprowadziłam reakcję redukcji grupy nitrowej. Spośród wielu wypróbowanych metod redukowania azowej i nitrowej grupy aromatycznej najskuteczniejsza okazała się redukcja wodorem w obecności platyny. Otrzymaną w wyniku redukcji aminę aromatyczną poddałam reakcji acylowania za pomocą chlorku 3-nitrobenzoilu. W celu syntezy kolejnych wiązań amidowych powtarzałam opisane procesy redukcji grupy nitrowej i acylowania.

Modelowanie molekularne potwierdziło, że karbocykliczne analogi netropsyny i distamycyny mogą służyć jako nośniki grup aktywnych w określone rejony DNA. Wybrałam chlorambucyl, alkilujący związek o znanym działaniu przeciwnowotworowym, jako grupę aktywną i otrzymane wcześniej aminy aromatyczne poddałam acylowaniu chlorkiem chlorambucylu, otrzymując dwufunkcyjne karbocykliczne leksitropsyny z dołączonym fragmentem alkilującym.

Zsyntezowane związki, zarówno z wolną grupą aminową, jak też podstawione fragmentem chlorambucylu, badałam w celu określenia ich aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek raka sutka MCF-7. Wszystkie analogi karbocykliczne wywoływały *in vitro* śmierć komórek raka sutka MCF-7 w zakresie stężeń 24.42 -105.35 μM . Analogi z grupami metoksyłowymi w pozycji *orto* do grupy amidowej były mniej aktywne wobec badanych komórek raka sutka MCF-7.

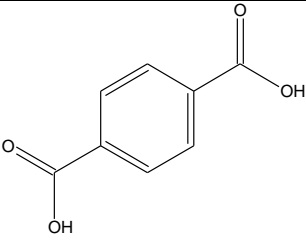
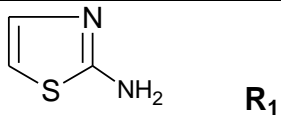
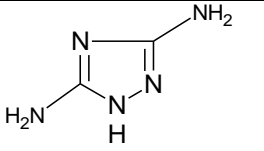
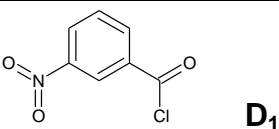
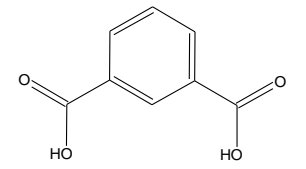
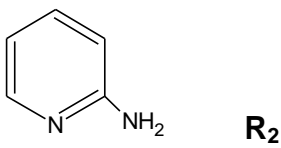
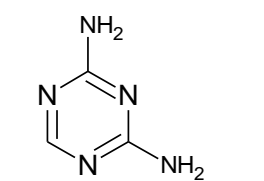
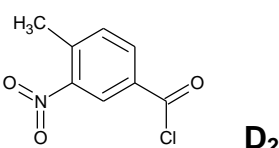
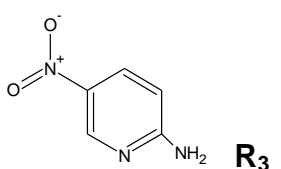
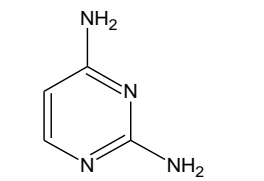
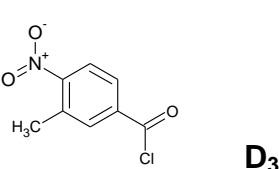
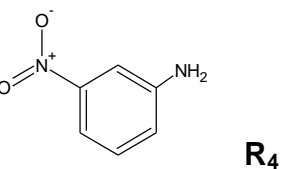
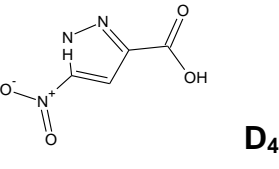
Obie opracowane przez mnie metody umożliwiają syntezę związków zawierających kilka wiązań amidowych i dobudowywanie dowolnej liczby pierścieni benzenowych. Otrzymane związki były trwalsze w porównaniu do analogów heterocyklicznych, z tego względu łatwiejsze było ich oczyszczenie i otrzymanie w większej ilości. W obu opisanych metodach syntezy ustaliłam optymalne warunki reakcji redukcji grup ochronnych oraz reakcji acylowania, stosowanych w celu dobudowania następnego fragmentu cząsteczki. Obie opracowane metody mogą być zastosowane do otrzymywania leksitropsyn z różnymi N-terminalnie przyłączonymi fragmentami związków o znanym działaniu. Jako najbardziej optymalną pod względem czasu i kosztów uznałam jednak metodę wykorzystującą grupę nitrową. W oparciu o tę metodykę opracowałam syntezę innych związków wiążących się w węższej bruździe.

Zaprojektowałam i wykonałam syntezę równoległe w roztworze, otrzymując dwie biblioteki symetrycznych analogów distamycyny (**1** i **2** - Tabela) zawierających różne pierścienie aromatyczne połączone wiązaniami amidowymi.

Zsyntezowałam i zbadałam 14 nowych związków zawierających dwie terminalne aromatyczne grupy aminowe oraz pierścienie benzenowe połączone wiązaniami amidowymi z wybranymi układami heterocyklicznymi. Pochodne zawierające w swej strukturze pierścień heterocykliczny wbudowany między pierścienie benzenowe [I], okazały się mniej aktywne w porównaniu do leksitropsyn zawierających układy heterocykliczne, jako fragmenty zewnętrzne [II].

Wszystkie karbocykliczne analogi distamycyny miały antyproliferacyjne właściwości wobec linii komórkowych raka sutka.

Tabela. 1. Analogi distamycyny – biblioteki 1 i 2.

Biblioteka 1 – związki RXR		Biblioteka 2 – związki DCD	
 X₁	 R₁	 C₁	 D₁
 X₂	 R₂	 C₂	 D₂
	 R₃	 C₃	 D₃
	 R₄		 D₄

Nowe związki wywoływały śmierć komórek głównie na drodze apoptozy, ocenianej zarówno metodą mikroskopii fluorescencyjnej, jak i cytometrii przepływowej. Wartości IC₅₀ wobec standardowej linii raka sutka MCF-7 wyznaczone dla związków z biblioteki 1 mieściło się w zakresie 183.53 – 232.50 μM, zaś dla związków biblioteki 2 w zakresie 4.35 – 12.66 μM. Związki z grupy 2 zbadano także na aktywność wobec estrogeno-niezależnej linii komórkowej raka sutka MDA-MB-231 otrzymując IC₅₀ w zakresie 3.47 – 12.53 μM.

Topoizomerazy stanowią ważny molekularny punkt uchwytu w terapii chorób nowotworowych, tym bardziej, że zwiększoną ekspresję tych enzymów wykazuje szereg komórek nowotworowych, w tym komórki raka piersi. Otrzymane analogi distamycyny poddałam badaniom mającym na celu potwierdzenie czy hamują one działanie topoizomeraz DNA. Badania prowadzone uprzednio, na związkach opisanych w pracy doktorskiej, wykazały, że leksitropsyny zawierające dwie podjednostki benzenowe były nieaktywne wobec topoizomeraz, zaś wszystkie analogi zawierające trzy grupy benzenokarboksyamidowe były wobec tych enzymów aktywne. Także analogi distamycyny z bibliotek **1** i **2** hamowały tworzenie form topologicznych DNA przez topoizomerazy I i II.

W ramach kontynuacji badań potwierdzających uniwersalność opracowanej metody zaprojektowałam syntezy kolejnych związków potencjalnie wiążących się z węższą bruzdą.

Węższa bruzda B-DNA jest bardzo interesującym celem w projektowaniu nowych leków z powodu niekowalencyjnych, wysoce specyficznych oddziaływań, które zachodzą w jej wnętrzu z wieloma małymi cząsteczkami. Do grupy związków wiążących się z węższą bruzdą podwójnej helisy DNA należą poza netropsyną i distamycyną Hoechst, berenil DAPI oraz grupa bisamidyn. Kontynuując badania w temacie syntezy i zależności struktura-aktywność różnych karbocyklicznych leksitropsyn, zsyntezowałam grupę związków potencjalnie wiążących się w węższej bruzdzie, wychodząc z chlorku 3-nitrobenzoilu i α,ω -diamin alifatycznych. Trzy z nowo otrzymanych struktur były podobne do bis-amidyn, trzy kolejne do bis-netropsyny [III].

Otrzymane bis-leksitropsyny zostały zbadane w celu określenia ich aktywności biologicznej. Interesujące okazały się wyniki ich działania na linie komórkowe raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231. IC_{50} wobec komórek MCF-7 wynosiło od 209.80 do nawet 483.12 μM , podczas gdy w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231 były to wartości od 8.10 do 17.52 μM . Wyniki te wskazują, że mechanizm działania tych związków jest zależny nie tylko od wiązania się z DNA ale może też być częściowo związany z faktem, że w komórkach MDA-Mb-231 obserwuje się wyższą ekspresję uPA/uPAR (*urokinase plasminogen activator system*) niż w komórkach MCF-7.

Wobec tego, oprócz oceny wpływu bis-leksitropsyn na przeżywalność komórek nowotworowych i aktywność topoizomeraz oraz potwierdzenia, iż wiążą się z DNA, podjęłam badania w celu stwierdzenia ich wpływu na aktywność amidolityczną enzymów proteolitycznych odgrywających ważną rolę w procesach nowotworowych – plazminy i urokinazy [IV].

Leksitropsyny nie są typowymi peptydami, jakkolwiek zbudowane są z fragmentów połączonych wiązaniami amidowymi, brak też było danych literaturowych sugerujących, że mogą być inhibitorami trypsynopodobnych proteaz, jak plazmina lub urokinaza. Jednak ugrupowania takie wykazują pewne podobieństwo do łańcucha bocznego lizyny. Dodatkową przesłanką był fakt, że związki te posiadają w swej strukturze wolne grupy aminowe związane z pierścieniami benzenowymi. Badane związki wykazały większe powinowactwo do plazminy i niektóre są jej specyficznymi inhibitorami. Natomiast otrzymane dotychczas inhibitory urokinazy o tego typu strukturze są także inhibitorami plazminy, a czasem również i trypsyny. Problem ten wymaga jednak dalszych badań.

Metodami biologii molekularnej potwierdziłam, że cząsteczki bis-leksitropsyn, zawierające wolną grupę aminową, mogą hamować katalityczną aktywność enzymów restrykcyjnych rozpoznających sekwencje AT [V]. Te syntetyczne oligopeptydy mogą służyć także jako nośniki grup aktywnych, co zilustrowałam, otrzymując ich pochodne chlorambucylowe [VI].

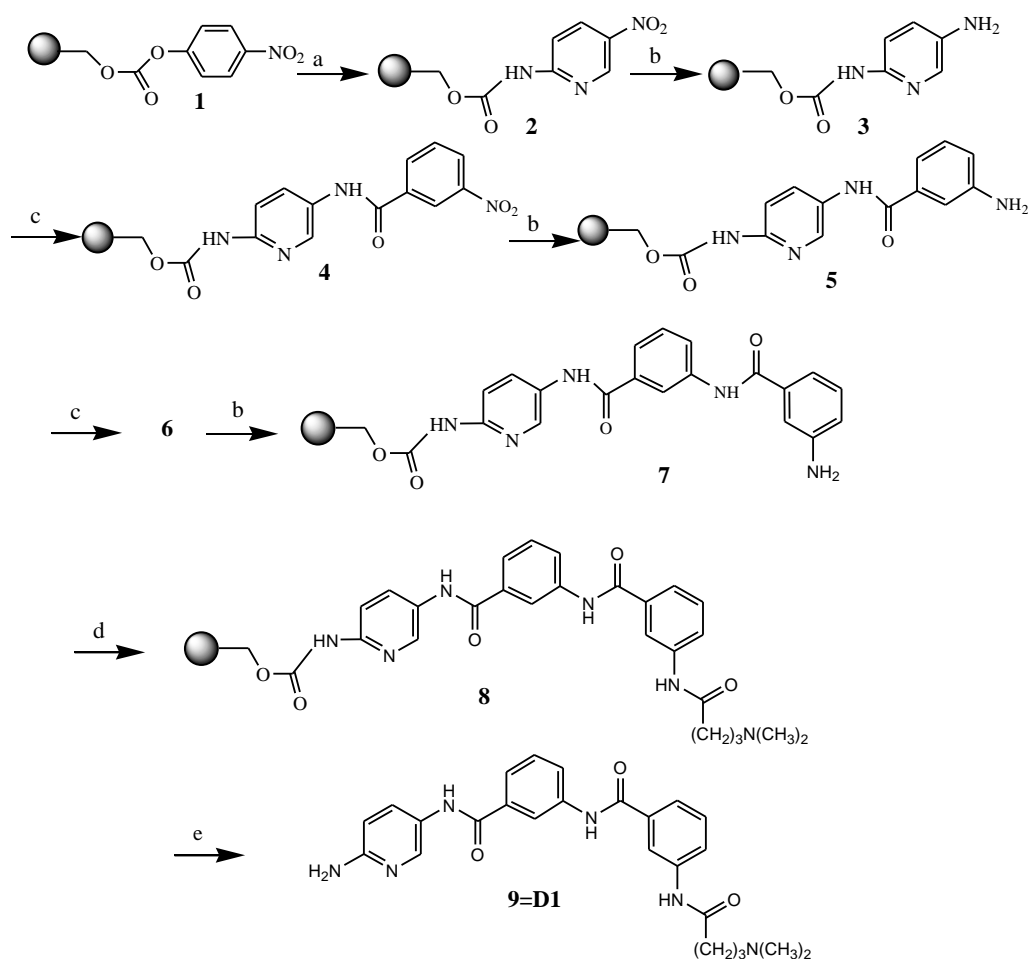
Nowoczesną, coraz powszechniej stosowaną metodą otrzymywania nowych związków jest obecnie synteza na fazie stałej (SPOS) (*Solid Phase Organic Synthesis*). Ten sposób prowadzenia syntezy na unieruchomionym na nośniku polimerycznym związku organicznym pozwala na przeprowadzenie szeregu reakcji chemicznych bez wyodrębniania produktów pośrednich.

Bazując na metodzie chemii kombinatorycznej „*split and mix*”, zaprojektowałam syntezę na fazie stałej analogów distamycyny i netropsyny. Celem planowanej pracy była synteza biblioteki kombinatorycznej zawierającej 900 analogów distamycyny oraz zbadanie aktywności biologicznej podbibliotek i wybór związków o największej aktywności biologicznej.

W celu osadzenia nitroamin na podłożu, do dziewięciu porcji żywicy Wanga z grupą p-nitrofenylową zostało dodane kolejno 9 nitroamin (**A₁-A₉**). Następnie złączyłam wszystkie porcje żywicy w jednym naczyniu. W kolejnym etapie podzieliłam żywicę na pięć porcji. Grupy nitrowe nowo powstałych związków redukowałam za pomocą chlorku tytanu(III), otrzymując wolne grupy aminowe, które następnie poddałam reakcji acylowania chlorkami acylowymi (**B₁-B₅**). Po kolejnej redukcji otrzymanych grup związków zakończonych grupą nitrową, oddzieliłam je od żywicy za pomocą kwasu trifluorooctowego.

Uzyskane w ten sposób podbiblioteki analogów netropsyny okazały się trudne w analizie, a wydajność procesu nie pozwoliła na otrzymanie odpowiedniej ilości każdego związku w mieszaninach, tak, by zbadać ich aktywność. Stwierdziłam, że podejście „dziel i mieszaj” nie znajduje zastosowania do tego rodzaju związków. Zoptymalizowałam warunki reakcji na podłożu stałym i opracowałam metodę syntezy, która może być zastosowana do otrzymywania analogów zarówno netropsyny, jak i distamycyny w metodzie równoległej.

Schemat 1. Synteza na podłożu stałym analogów distamycyny.



- (a) 2 -amino-5-nitropyrydyna **A1**, 12h, DCM, rt; (b) 1M SnCl_2 , 4h, DMF, rt;
(c) chlorek 3-nitrobenzoilu **B**, 4-DMAP, DCM, 24h, rt;
(d) "ester aktywny" **C**, DMF, 2h, 0°C i noc w temp. pok.;
(e) TFA / DCM (95:5)

Opracowaną metodę syntezy zastosowałam do otrzymania 6 nowych analogów distamycyny według Schematu 1 przedstawionego powyżej [VII].

Opracowana przez mnie strategia syntezy wiązań amidowych różni się od stosowanych wcześniej metod opartych na tradycyjnych, właściwych dla chemii peptydów grupach ochronnych i środkach kondensujących. Metoda ta zakłada stosowanie aromatycznych związków nitrowych – amin i chlorków acylowych, jako substratów w syntezie karbocyklicznych oligoamidów, do których należą analogi netropsyny i distamycyny.

Przy użyciu reaktora Syncore (Buchi), według procedur przedstawionych na Schemacie 1, zsyntezowałam trzy sześćoelementowe biblioteki analogów distamycyny, w których pierwszy, heterocykliczny pierścień był połączony z dwoma pierścieniami benzenowymi [VIII]. Każda z opisywanych grup związków różniła się położeniem podstawników w pierścieniu benzenowym – odpowiednio *para-para*, *meta-para* i *meta-meta*. W wyniku badania zdolności wiązania się otrzymanych związków z DNA, metodą wypierania bromku etydydy stwierdziłam, że wszystkie związki wiążą się z DNA, z czego 12 silniej niż distamycyna. Analogi z konfiguracją pierścieni benzenowych *meta-meta* najsilniej wygaszały fluorescencję. Obecność fragmentu 6-aminofenylowego w cząsteczce wzmacnia oddziaływanie związku z DNA w porównaniu do fragmentów heterocyklicznych. Związki zawierające fragment 6-amino-5-metylopirydynyłowy najslabiej wiązały się z DNA, bez względu na konfigurację dołączonych podjednostek benzenowych. Wyznaczenie stałych asocjacji pozwoli stwierdzić, czy i jak jest specyficzne oddziaływanie omawianych związków z określonymi sekwencjami dwuniciowego DNA.

Otrzymane związki zostaną poddane dalszym badaniom w celu oznaczenia ich aktywności biologicznej – właściwości cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych oraz zdolności hamowania aktywności topoisomeraz.

Opracowana przez mnie metoda syntezy na fazie stałej może być stosowana także do otrzymania analogów netropsyny oraz innych związków potencjalnie wiążących się w wąskim rowku B-DNA. Obecnie prowadzone są syntezy kolejnych bibliotek związków w celu wyselekcjonowania związków o największej sile wiązania z DNA.

Kontynuacja badań będzie polegała ponadto na wprowadzaniu fragmentów leksitropsynowych do pochodnych iperytowych, zawierających w strukturze oprócz fragmentu o właściwościach alkilujących, także fragment melaminowy. Jak wskazują doniesienia literaturowe z ostatnich kilku lat, związki zawierające w swej strukturze ugrupowanie melaminy są inhibitorami całego szeregu enzymów zaangażowanych w proces transkrypcji i translacji. Dalsze badania mają na celu stwierdzić, czy obecność fragmentu leksitropsynowego będzie sprzyjać poprawie selektywności działania nowych proleków sulfonianowych. Synteza i badanie właściwości tego typu związków stanowi drugi, ważny nurt w mojej pracy naukowej.

Wnioski

Karbocykliczne leksitropsyny, czyli karbocykliczne analogi distamycyny, netropsyny oraz innych związków wiążących się z węższą bruzdą DNA stanowią grupę potencjalnych środków przeciwnowotworowych o wielokierunkowym działaniu. Związki z tej grupy wywołują apoptozę komórek nowotworowych raka sutka, hamują działanie topoisomeraz, a poprzez selektywne wiązanie z DNA mogą też hamować

działanie enzymów restrykcyjnych. Nowe bis-leksitropsyny hamują amidolityczną aktywność enzymów z grupy trypsynopodobnych proteaz, jak plazmina lub urokinaza.

Opracowana metoda syntezy na podłożu stałym jest szybka, ekonomiczna i umożliwia otrzymywanie wielu nowych pochodnych o zróżnicowanych strukturach. Może być stosowana do syntezy bibliotek wielu analogów distamycyny, netropsyny i innych związków wiążących się w węższej bruzdzie. Metodę tę można też wykorzystać do dołączania różnorodnych grup aktywnych w celu otrzymania związków hybrydowych, o wielokierunkowej aktywności. Możliwe jest zautomatyzowanie procesu, co jest bardzo istotne w przypadku zwiększenia skali syntezy i produkcji związków jako leków.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od początku swojej pracy zawodowej jestem aktywnie zaangażowana w badania naukowe. Wyniki moich badań zostały opublikowane w czasopismach naukowych oraz były prezentowane (w formie plakatów i wystąpień ustnych) na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 72 doniesień naukowych – 27 prac oryginalnych (w tym 3 prace przyjęte do druku), 1 praca pogładowa, 3 referaty zjazdowe oraz 40 streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych w kraju i zagranicą. W moim dorobku naukowym jest ponadto 1 zgłoszenie patentowe oraz autorstwo rozdziału w książce. W 25 pracach i 30 komunikatach zjazdowych jestem pierwszym lub drugim autorem.

Sumaryczny *impact factor* moich publikacji naukowych wynosi 13.73. Za wszystkie osiągnięcia naukowe otrzymałam 277 punktów MNiSW.

Począwszy od 1993 roku, prezentowałam wyniki swoich badań na konferencjach naukowych dotyczących kierunków badań nad lekiem w Polsce (Kierunki badań nad lekiem w Polsce, Multidyscyplinarne Konferencje Nauki o Leku, Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego), syntezy organicznej (Doroczny Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, VII Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej, VII Konferencja Chromatograficzna, Polskie Sympozja Peptydowe) oraz chemii medycznej (Konwersatoria Chemii Medycznej). Ponadto rezultaty mojej pracy naukowej były przedstawiane na konferencjach międzynarodowych – 6th (1997), 7th (1999) i 8th (2001) International Symposium on "Molecular aspects of Chemotherapy w Gdańsku", 16th (2000) i 21th (2010)

International Symposium on Medicinal Chemistry, 2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences (2007), a także Joint Meetings on Medicinal Chemistry (2005 i 2007).

Uczestniczyłam również w konferencjach naukowych, takich jak III Krakowska Konferencja Chemii Leków 1995 (Modelowanie cząsteczkowe w chemii leków), Modyfikowane Kwasy Nukleinowe (Łódź 1998), 2nd International Conference on „Crystallography and Drug Design” (CDD’ 99), oraz w praktycznym kursie „Techniki analizy i detekcji kwasów nukleinowych i białek” (Poznań 2004).

W roku 1999 decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie uzyskałam stopień doktora nauk farmaceutycznych, ze specjalnością synteza leku, na podstawie obronionej rozprawy doktorskiej pt. „Modelowanie i synteza karbocyklicznych leksitropsyn”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Różańskiego.

Po obronie pracy doktorskiej, w trakcie pracy naukowej, zaprojektowałam i zrealizowałam w Zakładzie Chemii Organicznej UMB 9 uczelnianych projektów badawczych. W latach 2004-2007 kierowałam wykonaniem grantu MNiSW nr 2P05F 017 27, pt. „Analogi distamycyny i netropsyny – syntezy bibliotek kombinatorycznych, badanie *in vitro* właściwości przeciwnowotworowych, wiązania z DNA oraz wpływu na działanie topoizomerazy DNA”, wykonywanego we współpracy z pracownikami Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i Uniwersytetu w Białymstoku. Obecnie realizuję temat statutowy UMB oraz kieruję wykonaniem projektu badawczego MNiSW nr N N405 355537 (2009-2012), pt. „Synteza i badanie aktywności biologicznej hybrydowych proleków alkilujących”, realizowanego we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej.

W badaniach prowadzonych wraz z zespołem z Politechniki Łódzkiej nad nowymi triazynami zawierającymi podstawnik 2-chloroetyloaminowy (triazynowe iperyty azotowe) otrzymaliśmy triazynowe pochodne zawierające jedną, dwie lub trzy grupy 2-chloroetyloaminowe obdarzone właściwościami alkilującymi. Wstępny skrining wykazał, że iperytowe pochodne triazyny wykazują aktywność cytostatyczną przewyższającą w sprzyjających przypadkach chlorambucyl, użyty w badaniach, jako związek modelowy.

Przedmiotem wspólnego wynalazku jest nowy sposób otrzymywania triazynowych pochodnych iperytów azotowych, w którym jako prekursorów używa się soli N-triazynylo-1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktaniowych (alternatywnie tylko: N-triazynyloamoniowych). Reakcja chloro-1,3,5-triazyn oraz 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO) prowadzi do otrzymywania 2-[4-(2-chloroetyl)-piperazyn-1-yl]-4,6-dipodstawionych-[1,3,5]triazyn bez możliwości wyizolowania przejściowo tworzących się czwartorzędowych chlorków N-triazynyloamoniowych wywodzących się z DABCO, co związane jest z nietrwałością chlorków N-triazynyloamoniowych. Synteza stabilnych czwartorzędowych tetrafluoroboranów N-triazynyloamoniowych lub sulfonianów N-triazynyloamoniowych polega na reakcji wymiany anionu chlorkowego na mniej nukleofilowy anion tetrafluoroboranowy lub resztę kwasów sulfonowych. Z uwagi na fakt odwracalności reakcji wymiany anionów w obrębie soli N-triazynyloamoniowej możliwa jest również reakcja otrzymania odpowiedniego chlorku N-triazynyloamoniowego ze stabilnej soli N-triazynyloamoniowej. Nowy sposób otrzymywania triazynowych iperytów azotowych polega na przekształceniu stabilnych, rozpuszczalnych w wodzie proleków triazynowych

iperytów azotowych, będących solami N-triazynyloamoniowymi wywodzącymi się z DABCO, pod wpływem surowicy.

Nowy sposób opracowany w wynalazku jest dogodny preparatywnie, wykorzystuje łatwo dostępne i tanie odczynniki oraz wykazuje swoją skuteczność dla zróżnicowanej gamy pochodnych triazynowych. Zastosowanie rozpuszczalnych w wodzie, stabilnych proleków triazynowych iperytów azotowych umożliwia otrzymywanie leku przeciwnowotworowego w warunkach *in vivo* w surowicy.

W obecnie realizowanym projekcie badawczym MNiSW przedstawiona jest całkowicie nowa próba zaprojektowania i zsyntezowania koniugatów, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych, które łączą w sobie udokumentowane elementy odpowiedzialne za aktywność biologiczną. Zaproponowana metoda posiada charakter metody ogólnej i przy tym jest w pełnym zakresie rozwiązaniem oryginalnym. Wynikiem zamierzonych badań, prowadzonych wspólnie z pracownikami Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, powinno być stworzenie nowej generacji puli potencjalnych leków przeciwnowotworowych zawierających w swojej strukturze rdzeń melaminowy, czynnik alkilujący oraz czynniki poprawiające specyficzność działania, co powinno odzwierciedlać się w obniżeniu toksyczności. Jako czynnik poprawiający specyficzność, może być zastosowany fragment leksitropsynowy, rozpoznający sekwencje DNA.

W ramach realizacji tematów badawczych aktywnie współpracuję naukowo także z wieloma jednostkami Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, takimi jak Zakład Chemii Medycznej, Diagnostyki Hematologicznej, Endokrynologii Ginekologicznej, Farmakognozji czy Samodzielna Pracownia Analizy Leków.

W roku 2003 odbyłam pięciomiesięczny staż naukowy w Pracowni Chemii Biokoniugatów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciecha T. Markiewicza. We współpracy z tym zespołem opracowałam metodykę badań aktywności biologicznej związków i wprowadziłam elementy biologii molekularnej do prowadzonych w naszym Zakładzie badań dotyczących oceny aktywności nowo zsyntetyzowanych związków, w tym karbocyklicznych leksitropsyn, wobec DNA, topoiizomeraz i enzymów restrykcyjnych.

Recenzowałam publikacje w następujących czasopismach: *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *Archiv der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences* i *Letters in Drug Design & Discovery*.

W trakcie pracy na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku wielokrotnie otrzymywałam za działalność naukową nagrody Rektora UMB.

Danuta Dwozdowska