

Załącznik numer 2  
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

**AUTOREFERAT**  
**wersja polskojęzyczna**

**dr inż. Gabriela Pastuch-Gawolek**  
**Politechnika Śląska w Gliwicach**  
**Wydział Chemiczny**  
**Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii**

### 1. Imię i nazwisko

Gabriela Pastuch-Gawołek

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1989-1994 – Studia magisterskie

Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

Kierunek studiów: Technologia chemiczna

Specjalność: Technologia chemiczna organiczna

Uzyskany tytuł zawodowy: magister inżynier (praca obroniona z wyróżnieniem)

Tytuł pracy magisterskiej:

Badania utleniania 4,4-dinitrodifenylosulfidu i innych sulfidów do odpowiednich sulfonów nadtlaniem wodoru w układzie dwufazowym DCIE – woda wobec związków W(VI) i Mo(VI) oraz katalizatorów PTC.

Promotor: dr inż. Zbigniew Stec

1994-1995 – Asystent w Katedrze Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej

1995-1999 – Studia doktoranckie

Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

Dziedzina: Nauki chemiczne

Uzyskany stopień: doktor

Tytuł pracy doktorskiej:

Synteza i zastosowanie pochodnych 1-tiocukrów w reakcjach glikozylacji

Promotor: prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja

Recenzenci pracy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Wojciech Zieliński (Politechnika Śląska),  
prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz (Instytut Farmaceutyczny w Warszawie)

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1994 – 2002      **asystent**, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej

1995 – 1999      **studia doktoranckie**, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

2000 – 2001      **post-doktorant**, University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA, prof. W. Pribe

- 2002 – 2003      **adiunkt**, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej
- 2003 – nadal     **adiunkt**, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

#### 4. Wskazanie osiągnięcia naukowego

wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

##### a) Tytuł osiągnięcia naukowego

#### SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA GLIKOKONIUGATÓW ZAWIERAJĄCYCH UKŁAD HETEROARYLOWY

##### b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. Król, E.; Pastuch-Gawołek, G.; Chaubey, B.; Brzuska, G.; Erfurt, K.; Szewczyk, B. „Novel uridine glycoconjugates, derivatives of 4-aminophenyl 1-thioglycosides, as potential antiviral compounds”, *Molecules*, **2018**, 23, 1435. **IF<sub>2017</sub> = 3.098**; **IF<sub>5-letni</sub> = 3.268**; **30 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na rozwinięciu wcześniej zapoczątkowanej przeze mnie tematyki badawczej związanej z syntezą glikokoniugatów pochodnych urydyny poprzez zaproponowanie modyfikacji strukturalnych w opisywanych związkach, opracowaniu procedur syntetycznych dla opisywanych w pracy związków (syntezy zostały wykonane przeze mnie, a następnie powtórzone na większą skalę przez A. Chylek i K. Bolwoluk w ramach ich prac magisterskich), wykonaniu i analizie widm NMR oraz potwierdzeniu struktury uzyskanych związków na podstawie uzyskanych danych spektroskopowych, interpretacji uzyskanych wyników biologicznych pod kątem powiązania wpływu modyfikacji strukturalnych badanych związków na ich aktywność biologiczną, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 43%.*

2. Pastuch-Gawołek, G.; Chaubey, B.; Szewczyk, B.; Król, E. „Novel thioglycosyl analogs of glycosyltransferase substrates as antiviral compounds against classical swine fever virus and hepatitis C virus”, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 137, 247–262. **IF<sub>2017</sub> = 4.816**; **IF<sub>5-letni</sub> = 4.527**; **40 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, doborze struktury glikokoniugatów, opracowaniu syntez opisywanych w pracy związków (syntezy zostały wykonane przeze mnie, a następnie powtórzone na większą skalę przez K. Grubel i K. Czerwiec w ramach ich prac magisterskich), analizie widm NMR oraz potwierdzeniu struktury uzyskanych związków na podstawie uzyskanych danych spektroskopowych, interpretacji uzyskanych wyników biologicznych pod kątem powiązania wpływu struktury*

*związków na ich aktywność biologiczną, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 45%.*

3. Pastuch-Gawolek, G.; Pleśniak, M.; Komor, R.; Byczek-Wyrostek, A.; Erfurt, K.; Szeja, W. „Synthesis and preliminary biological assay of uridine glycoconjugates derivatives containing amide and/or 1,2,3-triazole linkers”, *Bioorg. Chem.*, **2017**, 72, 80–88. **IF<sub>2017</sub> = 3.929; IF<sub>5-letni</sub> = 3.390; 25 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, struktur glikokoniugatów, opracowaniu syntez opisywanych w pracy związków (większość syntez zostało wykonanych przez M. Pleśniaka, a kilka przez K. Chodor w ramach ich prac magisterskich), wykonaniu widm NMR oraz ich interpretacji, przeprowadzeniu badań biologicznych oraz ich interpretacji pod kątem powiązania wpływu struktury związków na ich aktywność biologiczną, przygotowaniu głównej części manuskryptu, korespondencji z Edytorem i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

4. Pastuch-Gawolek, G.; Malarz, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musioł, M.; Serda, M.; Czaplińska, B.; Musioł, R. „Small molecule glycoconjugates with anticancer activity”, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 112, 130–144. **IF<sub>2016</sub> = 4.519; IF<sub>5-letni</sub> = 4.187; 40 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na nawiązaniu współpracy z grupą zajmującą się pochodnymi chinoliny, zaproponowaniu poprawy ich właściwości biologicznych poprzez przyłączenie fragmentu cukrowego, zaproponowaniu struktur glikokoniugatów, opracowaniu syntez opisywanych w pracy związków (większość syntez zostało wykonanych przeze mnie i powtórzonych na większą skalę przez M. Wójtowicz i J. Skowrońskiego, a syntezę dwóch nowych związków wykonała M. Musioł- wszystko odbywało się w ramach prac magisterskich wykonywanych pod moim kierunkiem), wykonaniu widm NMR oraz ich interpretacji w celu potwierdzenia struktur uzyskanych glikokoniugatów, współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

5. Komor, K.; Szeja, W.; Komor, R.; Pastuch-Gawolek, G.; Thiem, J. „Synthesis of fucosylated uridine conjugates as potential glycosyltransferase inhibitors”, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2014**, 71, 1083–1089. **IF<sub>2014</sub> = 0.737; IF<sub>5-letni</sub> = 0.960; 15 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu przyłączenia fragmentu cukrowego otrzymanego w ramach doktoratu K. Komor do pochodnej urydyny i przebadania uzyskanych glikokoniugatów pod kątem zdolności do hamowania aktywności  $\beta$ -1,4-galaktozylotransferazy, syntezie pochodnej urydyny, zaproponowaniu sposobu oceny aktywności biologicznej uzyskanych połączeń, współudziale w oznaczaniu aktywności biologicznej uzyskanych glikokoniugatów, pomocy przy redagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

6. Król, E.; Pastuch-Gawołek, G.; Nidzworski, D.; Rychłowski, M.; Szeja, W.; Gryniewicz, G.; Szewczyk, B. „Synthesis and antiviral activity of a novel glycosyl sulfoxide against classical swine fever virus”, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 2662–2670. **IF<sub>2014</sub> = 2.793; IF<sub>5-letni</sub> = 2.970; 30 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu struktur sulfotlenków glikozylowych, dla których badano aktywność przeciwwirusową względem wirusa CSFV zakładając, że będą one zdolne do hamowania N-glikozylacji protein wirusowych, opracowaniu procedury syntezy badanych sulfotlenków (arylowych i heteroarylowych pochodnych D-glukozy, D-galaktozy oraz laktozy z różnymi typami grup zabezpieczających fragment cukrowy), w tym najaktywniejszego z nich opisanego w pracy (synteza i oczyszczanie tego związku zostały powtórzone na większą skalę przez K. Grubel w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moją opieką), analizie widm NMR, UV-Vis, IR oraz potwierdzeniu struktury badanych związków na podstawie uzyskanych danych spektroskopowych oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 25%.*

7. Komor, R.; Pastuch-Gawołek, G.; Sobania, A.; Jadwiński, M.; Szeja, W. „Application of different  $\alpha$ -1-thioglycosides preparation methods in synthesis of 5-nitro-2-pyridyl 1-thioglycosides – substrates in synthesis of conjugates with uridine moiety. Part I”, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2012**, 69, 1259–1269. **IF<sub>2012</sub> = 0.665; IF<sub>5-letni</sub> = 0.710; 15 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na sformułowaniu tematu badawczego, zaproponowaniu docelowych struktur, zaproponowaniu procedury syntezy zaprojektowanych związków, nadzorowaniu prac podczas syntezy dużej części tych struktur przez A. Sobania (w ramach pracy magisterskiej wykonywanej przez nią pod moim kierunkiem), interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia struktur opisanych w pracy oraz przyjęciu wiodącej roli podczas redagowania manuskryptu, korespondencji z Edytorem i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

8. Dzierzba, K.; Grec, M.; Pastuch-Gawołek, G.; Lipiński, T.; Pietkiewicz, J.; Gamian, A. „Synthesis of glycinated glycoconjugates based on 1-thioglycosides and their preliminary studies as potential immunomodulatory factor”, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2012**, 69, 1224–1238. **IF<sub>2012</sub> = 0.665; IF<sub>5-letni</sub> = 0.710; 15 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na nawiązaniu współpracy z grupą zajmującą się tematyką szczepionek przeciwko posocznicy, zaproponowaniu struktur cukrowych łączonych z proteinami, które następnie badano pod kątem immunoreaktywności, opracowaniu procedury syntez opisywanych w pracy związków (większość syntez zostało wykonanych przeze mnie i powtórzonych na większą skalę przez M. Kempę w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moim kierunkiem), wykonaniu widm NMR oraz ich interpretacji w celu potwierdzenia struktur uzyskanych związków oraz współredagowaniu manuskryptu oraz korespondencji z Edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

9. Pastuch, G.; Komor, R.; Grec, M.; Szeja, W. „5-Nitro-2-pyridyl 1-thioglycosides: application in synthesis of analogues of glycosyltransferases natural substrates”, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2010**, 67, 642–651. IF<sub>2010</sub> = **0.465**, IF<sub>5-letni</sub> = **brak danych**; **9 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na sformułowaniu tematu badawczego, zaprojektowaniu struktur glikokoniugatów oraz procedur syntetycznych prowadzących do uzyskania finalnych związków, syntezie części substratów do syntezy glikokoniugatów, nadzorowaniu prac podczas syntezy glikokoniugatów przez D. Pogoda (w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moim kierunkiem), interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia struktur opisanych w pracy oraz zredagowaniu manuskryptu i korespondencji z Edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

10. Pastuch-Gawolek, G.; Bieg, T.; Szeja, W.; Flasz, J. „5-Amino-2-pyridyl 1-thioglycosides in synthesis of analogs of glycosyltransferases substrates”, *Bioorg. Chem.*, **2009**, 37, 77–83. IF<sub>2009</sub> = **1.588**; IF<sub>5-letni</sub> = **1.944**; **20 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na sformułowaniu tematu badawczego, pozyskaniu finansowania na prowadzone badania w postaci grantu NCN, zaprojektowaniu struktur glikokoniugatów oraz procedur syntetycznych prowadzących do uzyskania finalnych struktur, syntezie tych glikokoniugatów (większość syntez zostało wykonanych przeze mnie, a niektóre powtórzone na większą skalę przez K. Grubel w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moim kierunkiem), interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia struktur opisanych w pracy oraz zredagowaniu manuskryptu i korespondencji z Edytorem i Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

11. Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. “Regio- and stereoselectivity in glycosylation of partially protected 1-thioglycosides with glycals”, *Pol. J. Chem.*, **2007**, 81, 161–170. IF<sub>2007</sub> = **0.483**; IF<sub>5-letni</sub> = **0.536**; **15 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu wykorzystania selektywnie zabezpieczonych pochodnych tioglikozydów jako akceptorów w reakcjach regioselektywnej glikozylacji, który to temat uściślono po dyskusjach ze współautorami, zaproponowaniu procedur syntetycznych prowadzących do uzyskania selektywnie zabezpieczonych akceptorów, przeprowadzeniu ich syntezy oraz reakcji glikozylacji z wytypowanymi glikalami, interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia struktur opisanych w pracy oraz współredagowaniu manuskryptu, korespondencji z Edytorem i dyskusji z Recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 55%.*

12. Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. „Stereoselective one-pot synthesis of isomaltooligosaccharides”, *Pol. J. Chem.*, **2003**, 77, 995–999. IF<sub>2003</sub> = **0.515**; IF<sub>5-letni</sub> = **brak danych**; **8 pkt MNiSW**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu zastosowania otrzymanego przeze mnie wcześniej (5-nitro-2-pirydylo) 2,3,4-tri-O-benzoilo-1-tio-β-D-glukopiranozydu jako akceptora w stereoselektywnej syntezie z innym tioglikozylowym donorem zawierającym rozbudowaną przestrzennie tritylową grupę zabezpieczającą faworyzującą powstawanie produktu glikozylacji o konfiguracji α, przeprowadzeniu reakcji glikozylacji oraz izolacji otrzymanych produktów, wspólnej z pozostałymi autorami interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia uzyskanych struktur oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

13. Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. „(5-Nitro-2-pyridyl) 1-thio-β-D-glucopyranoside as a stable and reactive acceptor”, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 9923–9926.  
**IF<sub>2000</sub> = 2.558; IF<sub>5-letni</sub> = brak danych**

*Mój udział w pracy polegał na zaproponowaniu wykorzystaniu 5-nitro-2-pirydylo 1-tioglukozydu otrzymanego w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej do otrzymania selektywnie zabezpieczonej pochodnej, która następnie została poddana glikozylacji z szeroką gamą donorów glikozylowych, zaproponowaniu procedur dotyczących syntezy tego akceptora, jak i glikozylacji, przeprowadzeniu wszystkich syntez z udostępnionymi mi donorami glikozylowymi, interpretacji danych spektroskopowych w celu potwierdzenia struktur opisanych w pracy oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.*

Wskaźnik Impact Factor (IF) podano zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku prac opublikowanych w roku 2018 przyjęto IF z roku 2017

**Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych prac : IF = 26.831**  
**Sumaryczna ilość punktów MNiSW wyżej wymienionych prac wynosi 262**

Szacunkowy, procentowy udział współautorów w poszczególnych pracach stanowiących osiągnięcie naukowe, przypisany na podstawie oszacowania wkładu pracy (zarówno merytorycznego, jak i praktycznego).

| Nr        | Publikacja                                                                                                                                                                                                                                                                   | Współautorzy                    | Procentowy udział współautorów | Liczba cytowań |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------|
| <b>H1</b> | Król, E.; Pastuch-Gawolek, G.; Chaubey, B.; Brzuska, G.; Erfurt, K.; Szewczyk, B. „Novel uridine glycoconjugates, derivatives of 4-aminophenyl 1-thioglycosides, as potential antiviral compounds”, <i>Molecules</i> , <b>2018</b> , 23, 1435.                               | Król Ewelina                    | 43                             | 0*<br>0**      |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>43</b>                      |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Chaubey Binay                   | 5                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Brzuska Gabriela                | 2                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Erfurt Karol                    | 2                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Szewczyk Bogusław               | 5                              |                |
| <b>H2</b> | Pastuch-Gawolek, G.; Chaubey, B.; Szewczyk, B.; Król, E. „Novel thioglycosyl analogs of glycosyltransferase substrates as antiviral compounds against classical swine fever virus and hepatitis C virus”, <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , <b>2017</b> , 137, 247–262.            | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>45</b>                      | 4*<br>5**      |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Chaubey Binay                   | 5                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Szewczyk Bogusław               | 5                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Król Ewelina                    | 45                             |                |
| <b>H3</b> | Pastuch-Gawolek, G.; Pleśniak, M.; Komor, R.; Byczek-Wyrostek, A.; Erfurt, K.; Szeja, W. „Synthesis and preliminary biological assay of uridine glycoconjugates derivatives containing amide and/or 1,2,3-triazole linkers”, <i>Bioorg. Chem.</i> , <b>2017</b> , 72, 80–88. | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>40</b>                      | 2*<br>2**      |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Pleśniak Mateusz                | 25                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Komor Roman                     | 10                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Byczek-Wyrostek Anna            | 10                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Erfurt Karol                    | 5                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Szeja Wiesław                   | 10                             |                |
| <b>H4</b> | Pastuch-Gawolek, G.; Malarz, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musioł, M.; Serda, M.; Czaplińska, B.; Musioł, R. „Small molecule glycoconjugates with anticancer activity”, <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , <b>2016</b> , 112, 130–144.                                               | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>30</b>                      | 8*<br>10**     |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Malarz Katarzyna                | 20                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Mrozek-Wilczkiewicz Anna        | 15                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Musioł Marta                    | 5                              |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Serda Maciej                    | 10                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Czaplińska Barbara              | 10                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Musioł Robert                   | 15                             |                |
| <b>H5</b> | Komor, K.; Szeja, W.; Komor, R.; Pastuch-Gawolek, G.; Thiem, J. „Synthesis of fucosylated uridine conjugates as potential glycosyltransferase inhibitors”, <i>Acta Pol. Pharm. Drug Res.</i> , <b>2014</b> , 71, 1083–1089.                                                  | Komor Katarzyna                 | 30                             | 0*<br>2**      |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Szeja Wiesław                   | 10                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Komor Roman                     | 20                             |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>30</b>                      |                |
|           |                                                                                                                                                                                                                                                                              | Thiem Joachim                   | 10                             |                |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                 |           |             |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-------------|
| <b>H6</b>  | Król, E.; Pastuch-Gawolek, G.; Nidzworski, D.; Rychłowski, M.; Szeja, W.; Gryniewicz, G.; Szewczyk, B. „Synthesis and antiviral activity of a novel glycosyl sulfoxide against classical swine fever virus”, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , <b>2014</b> , 22, 2662–2670.                                                                    | Król Ewelina                    | 55        | 6*<br>7**   |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>25</b> |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Nidzworski Dawid                | 3         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Rychłowski Michał               | 2         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szeja Wiesław                   | 5         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Gryniewicz Grzegorz             | 5         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szewczyk Bogusław               | 5         |             |
| <b>H7</b>  | Komor, R.; Pastuch-Gawolek, G.; Sobania, A.; Jadwiński, M.; Szeja, W. „Application of different $\alpha$ -1-thioglycosides preparation methods in synthesis of 5-nitro-2-pyridyl 1-thioglycosides – substrates in synthesis of conjugates with uridine moiety. Part I”, <i>Acta Pol. Pharm. Drug Res.</i> , <b>2012</b> , 69, 1259–1269. | Komor Roman                     | 20        | 5*<br>5**   |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>40</b> |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Sobania Agnieszka               | 25        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Jadwiński Michał                | 5         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szeja Wiesław                   | 10        |             |
| <b>H8</b>  | Dzierżba, K.; Grec, M.; Pastuch-Gawolek, G.; Lipiński, T.; Pietkiewicz, J.; Gamian, A. „Synthesis of glycinated glycoconjugates based on 1-thioglycosides and their preliminary studies as potential immunomodulatory factor”, <i>Acta Pol. Pharm. Drug Res.</i> , <b>2012</b> , 69, 1224–1238.                                          | Dzierżba Katarzyna              | 30        | 4*<br>4**   |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Grec Marta                      | 5         |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>30</b> |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Lipiński Tomasz                 | 10        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Pietkiewicz Jadwiga             | 10        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Gamian Andrzej                  | 15        |             |
| <b>H9</b>  | Pastuch, G.; Komor, R.; Grec, M.; Szeja, W. „5-Nitro-2-pyridyl 1-thioglycosides: application in synthesis of analogues of glycosyltransferases natural substrates”, <i>Acta Pol. Pharm. Drug Res.</i> , <b>2010</b> , 67, 642–651.                                                                                                       | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>60</b> | 3*<br>3**   |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Komor Roman                     | 20        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Grec Marta                      | 10        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szeja Wiesław                   | 10        |             |
| <b>H10</b> | Pastuch-Gawolek, G.; Bieg, T.; Szeja, W.; Flasz, J. „5-Amino-2-pyridyl 1-thioglycosides in synthesis of analogs of glycosyltransferases substrates”, <i>Bioorg. Chem.</i> , <b>2009</b> , 37, 77–83.                                                                                                                                     | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>60</b> | 10*<br>10** |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Bieg Tadeusz                    | 10        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szeja Wiesław                   | 15        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Flasz Jakub                     | 15        |             |
| <b>H11</b> | Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. “Regio- and stereoselectivity in glycosylation of partially protected 1-thioglycosides with glycals”, <i>Pol. J. Chem.</i> , <b>2007</b> , 81, 161–170.                                                                                                                                              | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>55</b> | 1*<br>1**   |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Wandzik Ilona                   | 35        |             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Szeja Wiesław                   | 10        |             |

**Załącznik nr 2** do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego – dr inż. Gabriela Pastuch-Gawolek  
**Autoreferat** – wersja polskojęzyczna

|            |                                                                                                                                                                                 |                                 |           |                                     |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| <b>H12</b> | Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. „Stereoselective one-pot synthesis of isomaltooligosaccharides”, <i>Pol. J. Chem.</i> , <b>2003</b> , 77, 995–999.                          | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>50</b> | 3 <sup>*</sup><br>3 <sup>**</sup>   |
|            |                                                                                                                                                                                 | Wandzik Ilona                   | 35        |                                     |
|            |                                                                                                                                                                                 | Szeja Wiesław                   | 15        |                                     |
| <b>H13</b> | Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. „(5–Nitro–2–pyridyl) 1-thio-β-D-glucopyranoside as a stable and reactive acceptor”, <i>Tetrahedron Lett.</i> , <b>2000</b> , 41, 9923–9926. | <b>Pastuch-Gawolek Gabriela</b> | <b>55</b> | 19 <sup>*</sup><br>19 <sup>**</sup> |
|            |                                                                                                                                                                                 | Wandzik Ilona                   | 25        |                                     |
|            |                                                                                                                                                                                 | Szeja Wiesław                   | 20        |                                     |

\* według bazy Web of Science na dzień 6.08.2018r

\*\* według bazy Scopus na dzień 6.08.2018r

**c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**Synteza i aktywność biologiczna glikokoniugatów zawierających układ heteroarylowy**

**Słowa kluczowe:** Glikokoniugaty, złożone pochodne cukrów, aktywność biologiczna, inhibitory enzymów, inhibitory glikozylotransferaz, hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, związki przeciwnowotworowe, aktywność przeciwwirusowa

**Wykaz stosowanych skrótów**

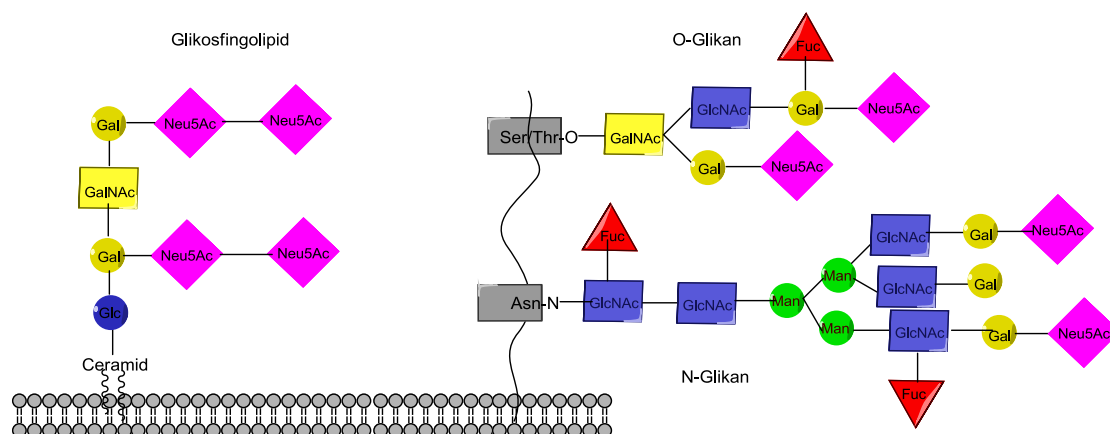
|                  |                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ac               | grupa acetylowa                                                                                     |
| AgOTf            | trifluorometanosulfonian srebra                                                                     |
| BAIB             | [bis(acetoksy)-jodo]benzen                                                                          |
| Bn               | grupa benzyłowa                                                                                     |
| BSA              | albumina bydlęca                                                                                    |
| Bz               | grupa benzoilowa                                                                                    |
| $\beta$ 1,4-GalT | $\beta$ -1,4-galaktozylotransferaza                                                                 |
| CDMT             | 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyna                                                               |
| CMP              | cytydino-5'-monofosforan                                                                            |
| CPS              | polisacharydy otoczkowe (ang. capsular polysaccharides)                                             |
| <i>m</i> -CPBA   | kwas <i>meta</i> -chloronadbenzoesowy                                                               |
| CSFV             | wirus klasycznej świńskiej gorączki (ang. Classical Swine Fever Virus)                              |
| CuAAC            | cykloaddycja azydo-alkinowa katalizowana miedzią (ang. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) |
| Dansyl           | grupa 5-(dimetyloamino)naftaleno-1-sulfonyłowa                                                      |
| DCC              | <i>N,N</i> -dicykloheksylokarbodiimid                                                               |
| DMAP             | 4-dimetyloaminopirydyna                                                                             |
| DMF              | <i>N,N</i> -dimetyloformamid                                                                        |
| DMTMM            | chlorek 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyno-2-ylo)-4-metylomorfoliny                                    |
| DU 145           | linia komórkowa raka prostaty                                                                       |
| Et               | grupa etylowa                                                                                       |
| Gal              | galaktoza                                                                                           |
| GlcNac           | N-acetyloglukozamina                                                                                |
| Glu              | glukoza                                                                                             |
| GLUT             | białkowe transportery glukozy                                                                       |
| GTs              | glikozylotransferazy                                                                                |
| HCT 116          | linia komórkowa raka jelita grubego                                                                 |
| HCV              | wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C Virus)                                             |
| HOBt             | <i>N</i> -hydroksybenzotriazol                                                                      |

|                  |                                                                                             |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| IC <sub>50</sub> | stężenie związku potrzebne do zredukowania aktywności enzymu lub proliferacji komórek o 50% |
| IDCP             | nadchloran jodo <i>bis</i> (2,4,6-kolidyny)                                                 |
| K <sub>i</sub>   | stała inhibicji enzymu                                                                      |
| K <sub>M</sub>   | stała Michaelisa                                                                            |
| sLe <sup>x</sup> | sialilo-Lewis <sup>x</sup>                                                                  |
| LG               | grupa odchodząca (ang. Leaving Group)                                                       |
| LPS              | lipopolisacharydy                                                                           |
| Me               | grupa metylowa                                                                              |
| MTT              | bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy                               |
| MW               | promieniowanie mikrofalowe                                                                  |
| MYO              | mioglobina końska                                                                           |
| NDP              | nukleozydo-5'-fosforan                                                                      |
| NeuAc            | kwasy <i>N</i> -acetyloneuraminowy                                                          |
| NIS              | <i>N</i> -jodoimid kwasu bursztynowego                                                      |
| NMM              | <i>N</i> -metylomorflina                                                                    |
| P                | grupa zabezpieczająca (ang. Protecting Group)                                               |
| ROS              | reaktywne formy tlenu                                                                       |
| SI               | indeks selektywności                                                                        |
| TBDMS            | grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa                                                   |
| TBDPS            | grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa                                                   |
| TEMPO            | <i>N</i> -tlenek 2,2,6,6-tetrametylopiperydyny                                              |
| TfOH             | kwasy triflowy, kwasy trifluorometanosulfonowy                                              |
| THF              | tetrahydrofuran                                                                             |
| TMSOTf           | triflan trimetylosililowy                                                                   |
| TPHB             | bromowodorek trifenylofosfiny                                                               |
| Tr               | grupa trytylowa (grupa trifenyłometylowa)                                                   |
| UDP              | urydyno-5'-difosforan                                                                       |

## **Wprowadzenie**

Cukry, zdefiniowane jako polihydroksyaldehydy, polihydroksyketony i ich pochodne są, obok aminokwasów, oligo- i polipeptydów, kwasów nukleinowych oraz lipidów, jedną z głównych klas związków naturalnych występujących w organizmach żywych. Do połowy ubiegłego stulecia były postrzegane głównie jako materiały budulcowe komórek. Wystarczy w tym przypadku wymienić takie biopolimery jak celuloza, hemicelulozy, pektyny czy chityna. Druga ważna funkcja węglowodanów to wykorzystanie ich jako materiał zapasowy w świecie roślinnym (skrobia, inulina) i w świecie zwierząt (glikogen). Do lat sześćdziesiątych XX wieku monosacharydy, cukry takie jak D-glukoza, D-fruktoza, produkty ich oligomeryzacji i polimeryzacji były rozpatrywane jako źródło energii w procesach biologicznych. Prowadzone do tego czasu badania naukowe ukierunkowane były na określenie mechanizmów ich metabolizmu oraz określenie mechanizmów tworzenia znanych biopolimerów. Dobrze znany był fakt, że złożone pochodne cukrów występują powszechnie w komórkach, ale dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku pojawiły się pierwsze prace poświęcone nie tylko budulcowej lub zapasowej funkcji cukrów, ale również wskazujące na kluczową ich rolę w procesach komórkowych. Było to związane z prężnym rozwojem glikobiologii rozumianej jako dziedzina nauki zajmująca się chemią cukrów i ich połączeń, ich biosyntezą i degradacją, poznaniem ich funkcji w złożonych układach biologicznych oraz ich analizą i modyfikowaniem.

Cukry naturalne mogą występować w postaci cukrów prostych (monosacharydów), oligo- i polisacharydów (glikanów) oraz złożonych pochodnych, glikokoniugatów, w których część cukrowa jest kowalencyjnie związana z częścią niecukrową (tzw. aglikonem). Do glikokoniugatów zaliczamy między innymi glikopeptydy, glikoproteiny, glikolipidy, proteoglikany czy glikozydy. Glikokoniugaty można znaleźć na powierzchni komórek, gdzie tworzą tzw. glikokaliks (Rysunek 1) [1].



Rysunek 1. Przykładowe struktury glikokoniugatów na powierzchni komórki.

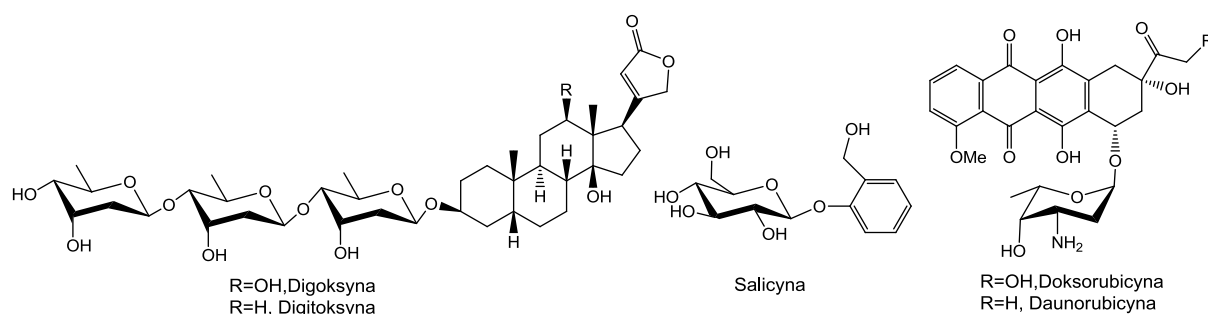
Intensywne badania naukowe prowadzone od drugiej połowy XX wieku dowiodły, że cukry oraz glikokoniugaty na powierzchni błony komórkowej odgrywają fundamentalną rolę w komunikacji międzykomórkowej, organizacji komórek, w rozpoznaniu międzykomórkowym, regulacji hormonalnej, adhezji patogenów rozpoznających i traktujących jako swój cel określone struktury cukrowe na powierzchni komórek gospodarza, odpowiedzi immunologicznej oraz w procesach powstawania nowotworów, w których stwierdzono zmiany w składzie fragmentu cukrowego glikoprotein na powierzchni receptorów odpowiedzialnych za rozwój nowotworów [2-6].

Tak istotne i zróżnicowane funkcje połączeń cukrów są możliwe dzięki temu, że glikany są najbardziej zróżnicowanymi biopolimerami naturalnymi i właśnie ta różnorodność strukturalna sprawia, że mogą kodować olbrzymią ilość informacji. To zróżnicowanie strukturalne połączeń cukrowych, w porównaniu do innych naturalnych biopolimerów takich jak polipeptydy czy kwasy nukleinowe, wynika z faktu że jednostki cukrowe zawierają szereg centrów stereogenicznych i grup funkcyjnych (hydroksylowych, aminowych), zdolnych do tworzenia różnorodnych wiązań między jednostkami cukrowymi i dowolnym aglikonem. Ponadto, występują zarówno w postaci pierścieni pięcio- jak i sześcioczłonowych.

Za biosyntezę glikokoniugatów odpowiada cała gama enzymów z grupy glikozylotransferaz (GTs), które przenoszą fragment cukrowy (mono lub oligosacharyd) z aktywowanego donora cukrowego (najczęściej nukleozydofosforanu cukrowego) do odpowiedniego akceptora, którym może być cukier, peptyd, białko, lipid lub inny fragment niecukrowy z utworzeniem głównie wiązania O- i N-glikozydowego, a także w mniejszym stopniu S- lub C-glikozydowego. Synteza związków pozwalających na kontrolę procesu glikozylacji, a tym samym zmianę lub zablokowanie aktywności glikokoniugatów, jest

aktualnym i intensywnie eksplorowanym tematem w chemii medycznej i farmaceutycznej. Znaczna część związków mających zdolność do hamowania aktywności GTs bazuje na analogach naturalnych substratów tych enzymów i w swej strukturze zawiera fragment cukrowy [7-11].

Z drugiej strony, naturalne produkty o małej masie cząsteczkowej zaliczane do tzw. metabolitów wtórnych, oferujące niespotykaną różnorodność strukturalną i wielokierunkowe działanie biologiczne, w dużej części w swej strukturze zawierają fragment cukrowy. Wśród znanych i opisanych metabolitów wtórnych, pełniących wiele ważnych funkcji regulacyjnych, znaczna ich część występuje w formie *O*-glikozydów. Ponieważ znaczną ilość tych związków zidentyfikowano jako istotne dla ludzkiej fizjologii i farmakologii, inspirowane to do poszukiwania ich analogów i mimetyków. Glikozydy takie jak salicyny, kardenolidy i antracykliny były jednymi z pierwszych udokumentowanych leków pochodzących ze źródeł naturalnych (Schemat 1) [12-15].



Schemat 1. *Metabolity wtórne stosowane jako leki*

Polisacharydy otoczkowe (CPS, ang. capsular polysaccharides) oraz lipopolisacharydy (LPS, ang. lipopolysaccharides) są obecne na powierzchni komórek drobnoustrojów (bakterii i wirusów) i mogą być rozpoznawane przez system immunologiczny gospodarza, czego efektem jest wytwarzanie przeciwciał przez zainfekowany organizm. Obserwacja ta może być wykorzystana do produkcji szczepionek zawierających antygeny polisacharydowe i zastosowania ich do immunizacji pozwalającej na obronę organizmu gospodarza przed patogenami. Pierwsze doniesienia dotyczące wykorzystania przeciwciał indukowanych przy pomocy polisacharydów uzyskiwanych z pneumokoków pojawiły się już na początku lat trzydziestych XX wieku [16].

Obecnie cukry, ich pochodne oraz połączenia z aglikonami niecukrowymi są wykorzystywane jako czynniki terapeutyczne np. leki nasercowe, leki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, a także szczepionki. Na bazie cukrów projektuje się również nowe związki wykazujące aktywność biologiczną pozwalającą na potencjalne ich zastosowanie w medycynie i farmacji. Istnieją różne podejścia w projektowaniu takich związków obejmujące:

- zastosowanie struktur natywnych glikanów wykazujących określoną aktywność biologiczną po optymalizacji warunków ich dostarczania do komórki. W wielu przypadkach tego typu połączenia pozyskiwane są ze źródeł naturalnych w ilościach niewystarczających do przeprowadzenia badań biologicznych, zwłaszcza w eksperymentach *in vivo*. Rozwiązaniem w tym przypadku jest ich synteza, jednak zwykle jest ona wieloetapowa i w konsekwencji prowadząca do uzyskania związków z małą wydajnością, dlatego niejednokrotnie jest to ekonomicznie nieuzasadnione. Problemem może być też niestabilność metaboliczna potencjalnego leku
- zastosowanie glikomimetyków, w których wprowadzone modyfikacje umożliwiają silniejsze oddziaływanie z docelowym receptorem. Takie podejście pozwala też na poprawę właściwości i zwiększenie stabilności *in vivo*
- zastosowanie związków zawierających szkielet cukrowy oraz moduł aktywny. Takie podejście pozwala na wykorzystanie różnorodności połączeń cukrowych do otrzymania wysoce funkcjonalnej i zróżnicowanej strukturalnie biblioteki połączeń
- zastosowanie biologicznie aktywnych związków połączonych z cukrami. W tym przypadku część cukrowa może pozwolić na przezwyciężenie problemu rozpuszczalności leku oraz modulowanie jego właściwości farmakokinetycznych [17-20].

Analiza danych literaturowych dała asumpt do skoncentrowania moich badań na projektowaniu i syntezie połączeń biologicznie aktywnych struktur z fragmentem cukrowym.

### **Założenia i cel badań**

Tematyka związana z heteroaromatycznymi pochodnymi cukrów była kontynuowana w oparciu o wyniki uzyskane w trakcie realizacji wcześniejszych badań, w ramach których opracowałam metodologię syntezy 1-tioglikozydów w reakcji aromatycznej substytucji

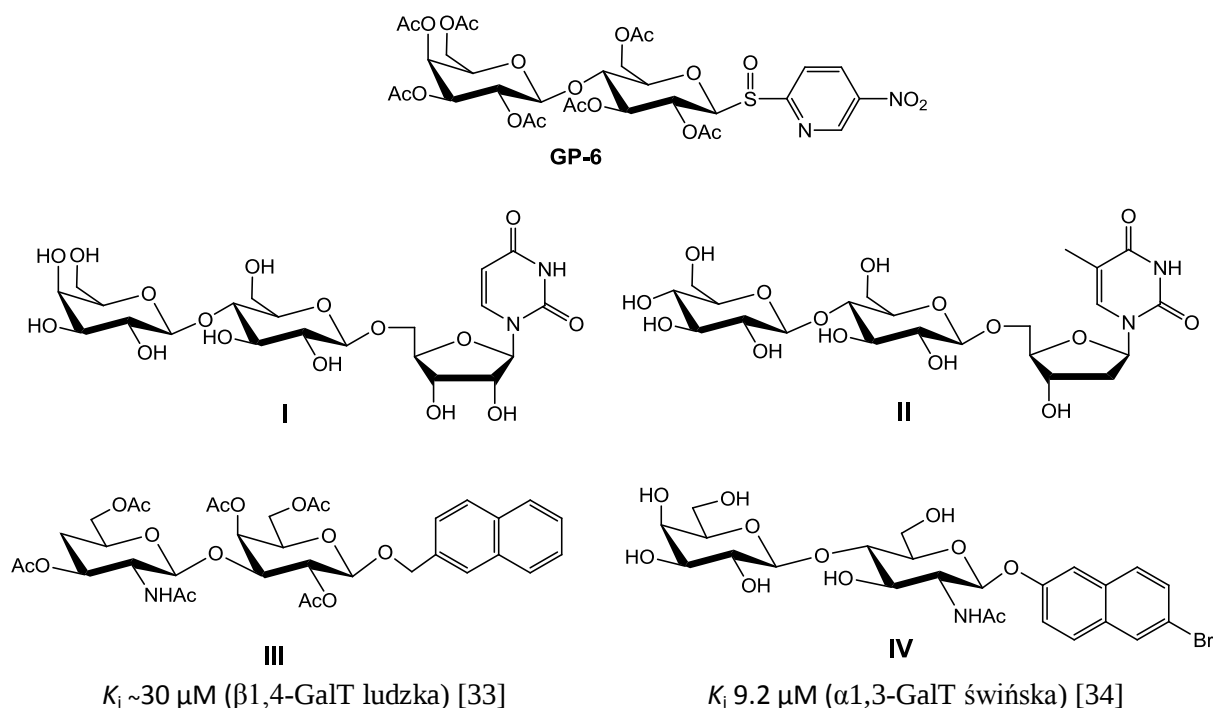
nukleofilowej halogenu w ujemnie podstawionych pochodnych pirydyny 1-tiocukrem. Korzystając z opracowanej metodologii otrzymałam bibliotekę 1-tioglikozydów pochodnych mono- i disacharydów [21, 22]. Tioglikozydy te zaprojektowałam jako alternatywę do wcześniej opisanych pochodnych stosowanych w reakcjach glikozylacji. Założyłam, że struktura tych związków, z uwagi na obniżenie nukleofilowości siarki przez elektronoakceptorowy podstawnik w pierścieniu aromatycznym aglikonu, pozwoli na zastosowanie ich w strategii tzw. latentnej glikozydacji opisanej przez Roya [23, 24]. Spodziewałam się, że będą one pełnić rolę „latentnych” (utajonych) akceptorów glikozylowych, które w następnym etapie mogą być „włączane” w reakcję glikozydacji jako donory glikozyłowe przez prostą transformację aglikonu związaną z kontrolowaną zmianą nukleofilowości siarki. Taka procedura pozwoliłaby na syntezę łańcucha oligosacharydowego w łagodnych warunkach i z dobrymi wydajnościami. Założone warunki spełniła jedna z zaprojektowanych pochodnych: (5-nitro-2-pirydylo)  $\beta$ -D-1-tioglukozyd, który dzięki selektywnemu zabezpieczeniu grup hydroksylowych w cukrze został zastosowany jako akceptor glikozyłowy, a uzyskany w ten sposób disacharyd, po utlenieniu do odpowiedniego sulfotlenku zastosowałam do syntezy trisacharydu [25].

Dalsze badania nad pochodnymi cukrowymi zawierającymi aglikon z fragmentem aromatycznym kontynuowałam podczas rocznego stażu po-doktorskiego w MD Anderson Cancer Center w Houston. Prace tam prowadzone polegały na wprowadzaniu modyfikacji we fragmencie cukrowym antracyklin, związków o znanej i udowodnionej aktywności interkalacyjnej do DNA [26]. Syntezowane modele miały w perspektywie zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe działające na zasadzie hamowania aktywności Topoizomerazy II.

Po zakończeniu stażu postanowiłam wykorzystać uzyskane doświadczenie do dalszych badań, a ich celem stała się synteza heteroaromatycznych pochodnych cukrów, które wykazywałyby aktywność biologiczną, w tym zdolność do hamowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za transfer jednostek cukrowych, działanie przeciwnowotworowe oraz zdolność aktywacji układu immunologicznego. W przypadku pozytywnego wyniku wstępnych badań biologicznych, związki takie mogą być przedmiotem badań nad zastosowaniem w terapii chorób nowotworowych oraz infekcji wirusowych bądź bakteryjnych. To właśnie stało się celem realizowanym w ramach prezentowanego cyklu prac.

Punktem wyjścia do konstrukcji tego typu połączeń były uzyskane wcześniej (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydy. Zachętą do wykorzystania tego typu pochodnych były obiecujące wstępne wyniki badań biologicznych mających na celu ocenę aktywności przeciwwirusowej

wybranych związków prowadzone przez dr Ewelinę Król z grupy profesora Bogusława Szewczyka z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego. Badaniom poddano arylo i heteroarylo 1-tioglikozydy oraz sulfotlenki arylowoglikozydowe, a modelem na którym badano aktywność tych pochodnych był wirus klasycznej świńskiej gorączki (CSFV, ang. Classical Swine Fever Virus) w komórkach nerki świńskiej SK6. Heteroarylowe pochodne cukrów były w stanie hamować namnażanie się wirusa, a najlepsze wyniki uzyskano dla sulfotlenku (5-nitro-2-pirydylo)-laktozylowego **GP-6** (Schemat 2), który otrzymałam poprzez utlenianie (5-nitro-2-pirydylo) per-*O*-acetylo-1-tio- $\beta$ -laktozydu działaniem kwasu *m*-chloro-nadbenzoesowego (*m*-CPBA). 1-Tioglikozyd utleniałam równomolową ilością *m*-CPBA w obniżonej temperaturze. [27, 28, 29 (**H6**)]. Założono, na podstawie doniesień literaturowych [30], że zaobserwowane działanie przeciwwirusowe miało związek z inhibicją glikozylacji i zmianą w strukturze glikoprotein na powierzchni wirusa, co uniemożliwiło namnażanie wirusów w zainfekowanych komórkach.



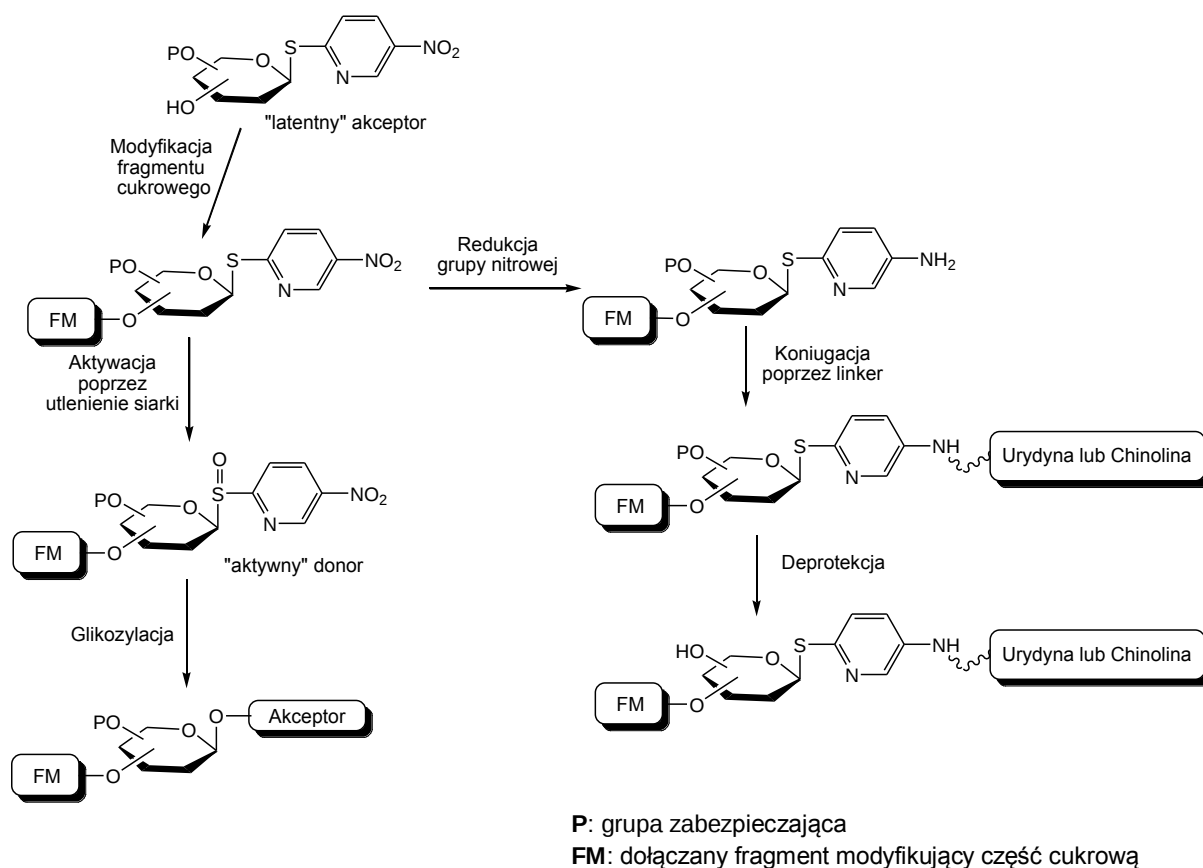
Schemat 2. Struktury związków wykazujących aktywność biologiczną

W literaturze opisano pochodne zawierające fragment disacharydowy połączony, podobnie jak ma to miejsce w przypadku pochodnej **GP-6**, wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z urydyną **I** [31] bądź tymidyną **II** [32], które były w stanie hamować aktywność enzymów

z grupy glikozylotransferaz (Schemat 2). W tym przypadku zakładano, że związki te są analogami UDP-Gal, czyli substratu typu donora dla  $\beta$ 1,4-GalT. Opisano również, że wprowadzenie alkiloaromatycznego aglikonu w cukrze poprawia wiązanie z białkiem i skutecznie hamuje aktywność enzymów z grupy GTs. Acetylowany 4'-deoksydisacharyd z aglikonem aromatycznym **III** zastosowano jako analog akceptora ludzkiej  $\beta$ 1,4-GalT1 zaangażowanej w biosyntezę sLe<sup>x</sup>. Pochodna ta wiąże się w miejscu wiązania akceptora i jest inhibitorem kompetycyjnym enzymu. Dzięki obecności zabezpieczeń acetylowych pochodna ta jest zdolna do penetrowania błon biologicznych i wykazuje zdolność do hamowania biosyntezy sLe<sup>x</sup> *in vivo* w komórkach nowotworowych chłoniaka oraz raka płuc. Te same badania wykazały aktywność odbezpieczonego analogu związku **III** względem ludzkiej  $\beta$ 1,4-GalT1 na poziomie  $K_i=192\ \mu\text{M}$  [33]. Wprowadzenie aglikonu aromatycznego (grupy 2-naftyłowej) w związku **IV** pozwoliło z kolei na otrzymanie inhibitora  $\alpha$ 1,3-GalT [34].

Zakładając, że związek **GP-6**, podobnie jak wymienione inhibitory **I-IV** (Schemat 2), konkuruje z naturalnym substratem GTs o miejsce w centrum aktywnym, zaprojektowałam i zsyntezowałam całą gamę pochodnych mogących wykazywać podobną lub lepszą aktywność biologiczną.

Modyfikacje strukturalne w projektowanych związkach dotyczą zarówno fragmentu cukrowego, jak i możliwości jego połączenia poprzez linker zawierający układ heteroaromatyczny z fragmentem istotnym z punktu widzenia aktywności biologicznej, np. urydyną bądź chinoliną. Jako akceptory do modyfikacji i rozbudowy fragmentu cukrowego zastosowałam selektywnie zabezpieczone pochodne (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów. Na początku sprawdziłam ich stabilność wobec szerokiej gamy promotorów glikozylacji, co stworzyło przesłanki do zastosowania ich w reakcjach z różnego typu donorami glikozylowymi. Ponadto, poprzez wprowadzenie odpowiednich grup zabezpieczających, można sterować reaktywnością poszczególnych grup hydroksylowych w tego typu akceptorze i zastosować go w regioselektywnej glikozylacji bądź modyfikacji grup hydroksylowych. Z drugiej strony, można zaktywować przejściowo „latentny” aglikon i zastosować uzyskaną pochodną w reakcji glikozylacji z kolejną cząsteczką akceptora (co udowodniłam wcześniej), bądź też (co wydaje się bardziej interesujące) skorzystać z obecności w aglikonie grupy nitrowej, poddać ją redukcji i powstałą w jej wyniku grupę aminową wykorzystać do łączenia, bezpośredniego lub z wykorzystaniem linkera, z pochodnymi urydyny bądź chinoliny (Schemat 3).



Schemat 3. Modyfikacje strukturalne projektowanych związków

Zarówno urydyna, jak i chinolina nie zostały wybrane przypadkowo jako fragmenty koniugowane z pochodnymi cukrowymi. Z doniesień literaturowych wynika, że urydyna obecna w substracie GTs typu donora odgrywa kluczową rolę w procesie wiązania z centrum aktywnym tych enzymów i ściśle oddziałuje z białkiem enzymatycznym [35]. Tak więc, chcąc uzyskać struktury mające konkurować o miejsce w centrum aktywnym enzymu z jego naturalnym substratem, należy włączyć ten fragment do docelowej struktury. W naturalnych substratach GTs typu donora cukier połączony jest z urydyną poprzez ugrupowanie fosfoestrowe, które pozwala na lokowanie tego substratu w centrum aktywnym poprzez wiązanie koordynacyjne z dwuwartościowymi jonami metalu [7]. Tak więc w projektowanych analogach strukturalnych substratów GTs pomiędzy cukrem i urydyną również powinien występować łącznik zdolny do koordynowania jonów metali. Funkcję takiego łącznika może pełnić fragment heteroaromatyczny (wykorzystanie wolnych par elektronowych heteroatomów do wiązania z metalem) w połączeniu z obecnością wiązania amidowego i/lub estrowego i/lub fragmentu alkilowego zwiększającego elastyczność takiego łącznika.

W przypadku chinoliny, to 8-hydroksychinolina i jej pochodne znane są ze zdolności do kompleksowania szeregu jonów metali, a także z szerokiego spektrum aktywności biologicznej. Pochodne chinoliny działają przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo, przeciw pierwotniakowo, a także antyseptycznie [36]. W ostatnich latach obserwuje się również wzrost zainteresowania ich aktywnością przeciwnowotworową, która łączona jest ze wspomnianą zdolnością do wiązania jonów metali. Koncepcję połączenia pochodnych chinoliny z fragmentem cukrowym, który poprawia ich biodostępność i ułatwia transport do komórek nowotworowych ze względu na nadekspresję transporterów glukozy w tych komórkach, opisała grupa G. Vecchio [37, 38]. Otrzymane glikozydy chinolinowe badano jako potencjalne proleki chelatorowe jonów miedzi i cynku, które uwalniają aktywny biologicznie związek po wnikięciu do komórki pod działaniem enzymów z grupy glikozydaz. Obiecujące wyniki tych badań zachęcają do kontynuacji tematu łączenia cukrów z pochodnymi chinoliny.

W łączniku pomiędzy fragmentem cukrowym a pochodnymi urydyny i chinoliny istotny jest układ heteroaromatyczny taki jak pirydyna lub triazol. Aby udowodnić, że układ heteroaromatyczny w glikokoniugacie ma istotny wpływ na jego aktywność biologiczną zaplanowałam również syntezę połączeń, w których układ ten wyeliminowano ze struktury łącznika.

Uzyskane związki postanowiłam przebadac pod kątem zdolności do hamowania aktywności izolowanego enzymu z grupy GTs na przykładzie  $\beta$ 1,4-GalT. Z kolei w badaniach *in vitro* postanowiłam ocenić ich aktywność przeciwwirusową i przeciwnowotworową, a także ocenić je pod kątem immunogenności.

Realizacja zaplanowanej tematyki wymagała wykonania następujących zadań badawczych:

- modyfikacji fragmentu cukrowego wytypowanych (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów poprzez wprowadzenie różnych grup ochronnych oraz ich glikozylacji działaniem konwencjonalnych donorów glikozylowych
- modyfikacji wytypowanych związków poprzez wprowadzenie epitopu glicynowego, co pozwoliło na ich zastosowanie do wywoływania odpowiedzi immunologicznej
- opracowania procedur pozwalających na syntezę związków biologicznie aktywnych, w tym potencjalnych inhibitorów GTs zawierających w swej strukturze fragment urydynowy oraz glikokoniugatów chinolinowych

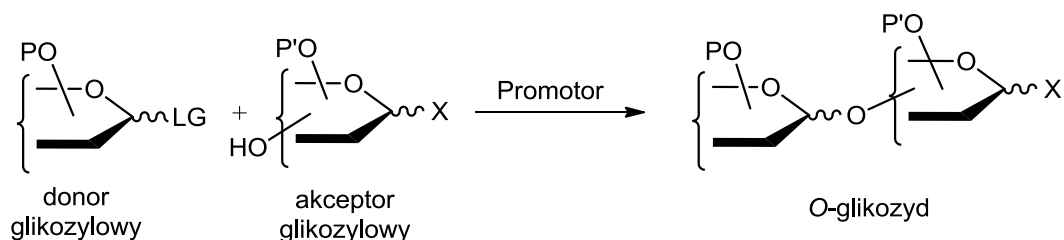
- oceny aktywności biologicznej uzyskanych połączeń obejmującej inhibicję  $\beta$ 1,4-GalT, działanie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe.

## Opis osiągnięcia naukowego

### 1. Zastosowanie heteroarylo 1-tioglikozydów w modyfikacjach fragmentu cukrowego

W ramach prezentowanej pracy zaplanowałam i przeprowadziłam syntezę dużej grupy pochodnych cukrowych (glikokoniugatów), a następnie oceniłam ich aktywność biologiczną. Aby móc sprawnie modyfikować strukturę fragmentu cukrowego tych połączeń należy poświęcić nieco uwagi reakcji glikozylacji.

Reakcja glikozylacji zachodzi najczęściej według mechanizmu substytucji nukleofilowej przy anomerycznym atomie węgla tzw. donora glikozylowego, który posiada grupę dobrze odchodzącą (LG, ang. Leaving Group) połączoną z anomerycznym atomem węgla. Donor glikozylowy reaguje z akceptorem glikozylowym, który posiada grupę o właściwościach nukleofilowych, a aktywacja grupy odchodzącej zachodzi przy udziale odpowiedniego dla danej grupy promotora/ aktywatora lub znacznie rzadziej katalizatora (Schemat 4).

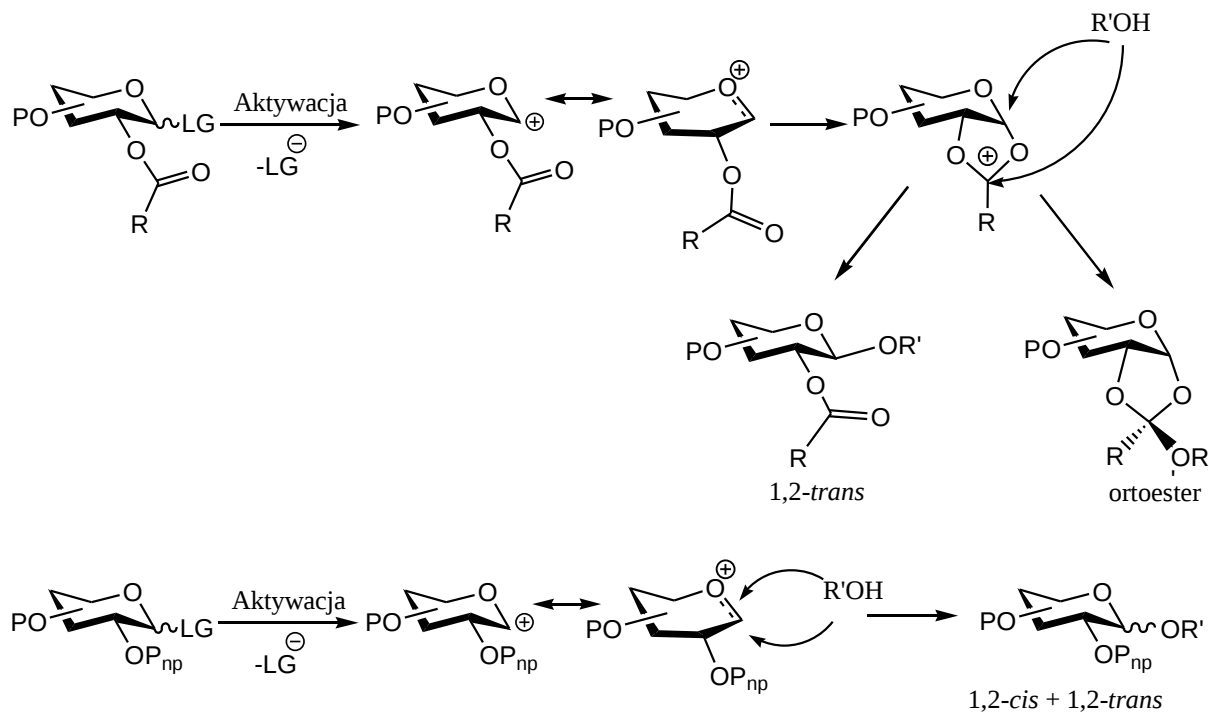


Schemat 4. Tworzenie wiązania O-glikozydowego

Ponieważ substraty w reakcji glikozylacji to zwykle związki wielofunkcyjne, dla zapewnienia regioselektywności tej reakcji wskazane jest selektywne zabezpieczenie grup, które nie mają brać w niej udziału z użyciem odpowiednio dobranych grup zabezpieczających (P, ang. Protecting Group). Warunki reakcji glikozylacji muszą być tak dobrane, aby grupy zabezpieczające oraz już istniejące w reagujących cząsteczkach wiązania glikozydowe nie uległy w trakcie reakcji niepożądanym transformacjom.

W trakcie reakcji glikozylacji mogą powstać dwa izomeryczne produkty, a na stereoselektywność tej reakcji wpływ ma cały szereg czynników spośród których wymienić można: efekt anomeryczny, struktura donora i akceptora glikozylowego, rodzaj

grup zabezpieczających, rodzaj grupy odchodzącej, rodzaj rozpuszczalnika, użyty w reakcji promotor, temperatura czy ciśnienie. Największy wpływ na stereoselektywność glikozylacji ma rodzaj grupy przy węglu sąsiadującym z pozycją anomeryczną. Efekt grupy sąsiadującej (nazywanej często w literaturze grupą partycypującą) pozwala na otrzymywanie *1,2-trans* glikozydów w przypadku gdy w pozycji C-2 donora znajduje się ugrupowanie estrowe lub amidowe (Schemat 5).



P<sub>np</sub>: grupa niepartycypująca

Schemat 5. *Efekt grupy sąsiadującej na stereoselektywność glikozylacji*

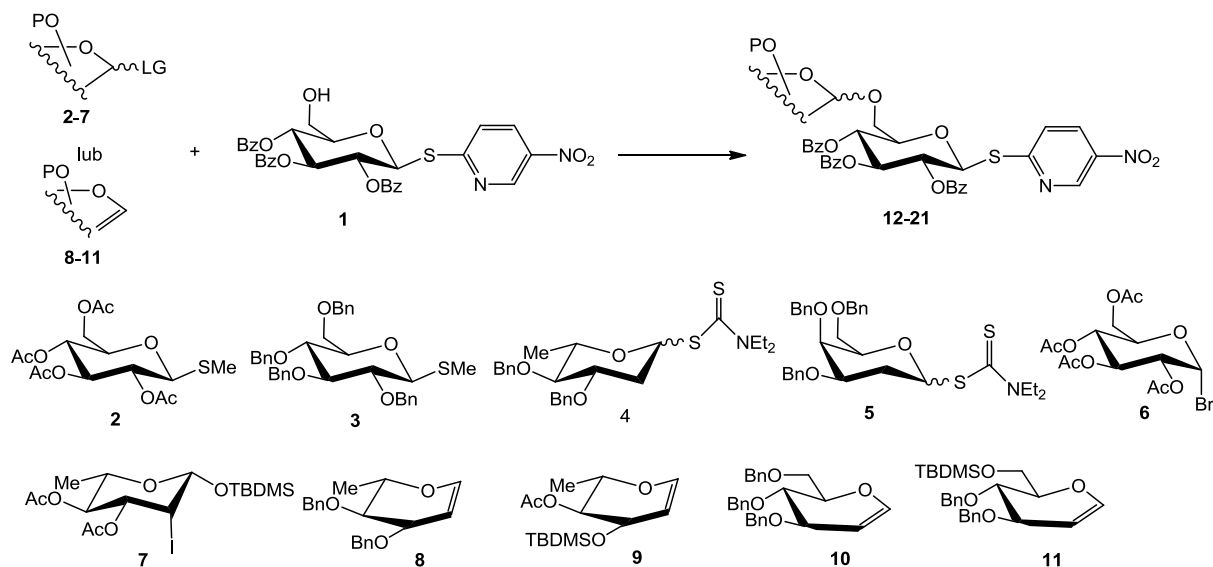
Wolna para elektronowa tlenu karbonylowego w takiej grupie może brać udział w stabilizowaniu karbokationu utworzonego po odejściu grupy z pozycji anomerycznej donora. Tworzy się wówczas bitykliczny jon acyloksoniowy co powoduje, że ze względu na zawadę sterczyną, atak nukleofila możliwy jest jedynie z przeciwnej strony pierścienia. W takim przypadku glikozyd o konfiguracji *1,2-trans* tworzy się z bardzo wysoką stereoselektywnością. Produktem ubocznym w tego typu reakcjach może być ortoester powstający w wyniku ataku nukleofila na karboksylowy atom węgla. W przypadku braku grupy partycypującej w pozycji C-2 donora, atak nukleofila możliwy jest z obu stron płaskiego jonu oksokarbeniowego, co powoduje powstanie mieszaniny anomerycznych produktów. Na proporcje mieszaniny glikozydów wpływ ma szereg czynników, w tym rodzaj

grupy odchodzącej, a także typ i wielkość grup zabezpieczających w donorze oraz w akceptorze [39].

Pośród bardzo bogatej grupy związków stosowanych jako donory w reakcjach glikozylacji nieprzypadkowo wybrano 1-tioglikozydy. Naturalne glikokoniugaty, ze względu na połączenie cukru z aglikonem poprzez wiązanie O-glikozydowe są stosunkowo mało stabilne w systemach biologicznych gdyż ulegają degradacji pod działaniem glikozylohydrolaz. Jednym z możliwych rozwiązań tego problemu przy syntezie glikokoniugatów jest zastąpienie glikozydowego atomu tlenu przez heteroatomy i uzyskanie połączeń o zmienionych właściwościach wiązania z białkami oraz zwiększonej stabilności na degradację enzymatyczną. Najczęściej w takich przypadkach stosuje się połączenia, w których jednostki cukrowe związane są poprzez atomy siarki, selenu, azotu lub węgla. Najczęstsze modyfikacje dotyczą właśnie zamiany atomu tlenu na atom siarki.

Zakładając, że po modyfikacji fragmentu cukrowego akceptora, powstały cukier będzie łączony z fragmentem biologicznie aktywnym tworząc glikokoniugat, to zastąpienie atomu tlenu w anomerycznej części cukru poprzez atom siarki pozwoli na modyfikację, która jest akceptowana przez większość systemów biologicznych (enzymy, linie komórkowe), a jednocześnie zwiększy stabilność uzyskanych glikokoniugatów. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne pochodnych zawierających atom siarki zamiast tlenu wynikają z różnic w rozkładzie gęstości elektronowej i elektroujemności obu atomów. Tym samym obniża się podatność hydrolityczna wiązania węgiel anomeryczny-siarka (C-S) w porównaniu z wiązaniem węgiel-tlen (C-O). Tioglikozydy są znacznie bardziej odporne na działanie enzymów hydrolitycznych i bardziej stabilne w systemach biologicznych. Połączenia różniące się obecnością O- lub S- mogą wykazywać nieznaczne różnice w orientacji wiązania glikozydowego [40] i konformacji pierścienia cukrowego [41], na co wpływ ma głównie różnica w długości wiązania C-S (1.78 Å) i C-O (1.42 Å) oraz kąt pomiędzy wiązaniami C-S-C (99°) oraz C-O-C (114°) [42]. Jednak pomimo tych niewielkich różnic, tioglikozydy wykazują się aktywnością biologiczną porównywalną z naturalnymi odpowiednikami, przy jednoczesnej zwiększonej stabilności [43, 44].

Kolejną zaletą ujemnie podstawionych arylo 1-tioglikozydów jest możliwość zastosowania ich w strategii latentnej glikozylacji bazującej na różnicy w reaktywności centrów anomerycznych donora i akceptora glikozyłowego [23].



Schemat 6. Zastosowanie (5-nitro-2-pirydylo) 2,3,4-tri-O-benzoilo-1-tio-β-D-glukopiranozydu jako latentnego akceptora glikozylowego

Koncepcję tę wykorzystałam stosując jako latentny akceptor glikozylowy (5-nitro-2-pirydylo) 2,3,4-tri-O-benzoilo-1-tio-β-D-glukopiranozyd **1** w obecności różnie zabezpieczonych pochodnych tiocukrów **2–5**, acetylowanego bromku glukozyłu **6** [45, (**H13**)], 3,4-di-O-acetylo-2-jodo-2,6-dideoksy-1-tert-butyldimetylosililo-α-L-mannopiranozydu **7** [46 (**H9**)] oraz zabezpieczonych glikali **8–11** [47 (**H11**), 48] jako reaktywnych donorów glikozylowych (schemat 6). Aby potwierdzić stabilność pochodnej **1** poddałam ją reakcji glikozylacji z takimi modelowymi akceptorami jak metanol oraz 1,2,3,4-di-O-izopropylideno-α-D-galaktopiranoza w obecności aktywatorów takich jak Ag<sub>2</sub>O, triflan trimetylosililowy (TMSOTf), triflan srebra (AgOTf), N-jodoimid kwasu bursztynowego (NIS), układ NIS/ kwas triflowy (TfOH) czy nadchloran jodo bis(2,4,6-kolidyny) (IDCP). Po stwierdzeniu stabilności związku **1** w tych warunkach, zastosowałam go jako akceptor w reakcjach z donorami **2–11** (Schemat 6). Uzyskane wyniki (Tabela 1) wskazują na dużą stabilność testowanego latentnego tioglikozydu **1** w bardzo różnorodnych warunkach aktywacji i wobec różnych donorów glikozylowych. W omawianych przypadkach, na stereoselektywność reakcji glikozylacji wpływ miał rodzaj grup zabezpieczających w donorze glikozylowym. Użycie donorów **2** i **6**, w których w pozycji C-2 obecna była partycypująca grupa acetylowa, zapewniło wysoką enancjoselektywność reakcji glikozylacji, w wyniku której otrzymano wyłącznie produkty o konfiguracji β. Z kolei wprowadzenie stosunkowo dużych benzytowych grup zabezpieczających w 2-deoksy pochodnej 1-tiocukru **5** skutkowało powstaniem disacharydu

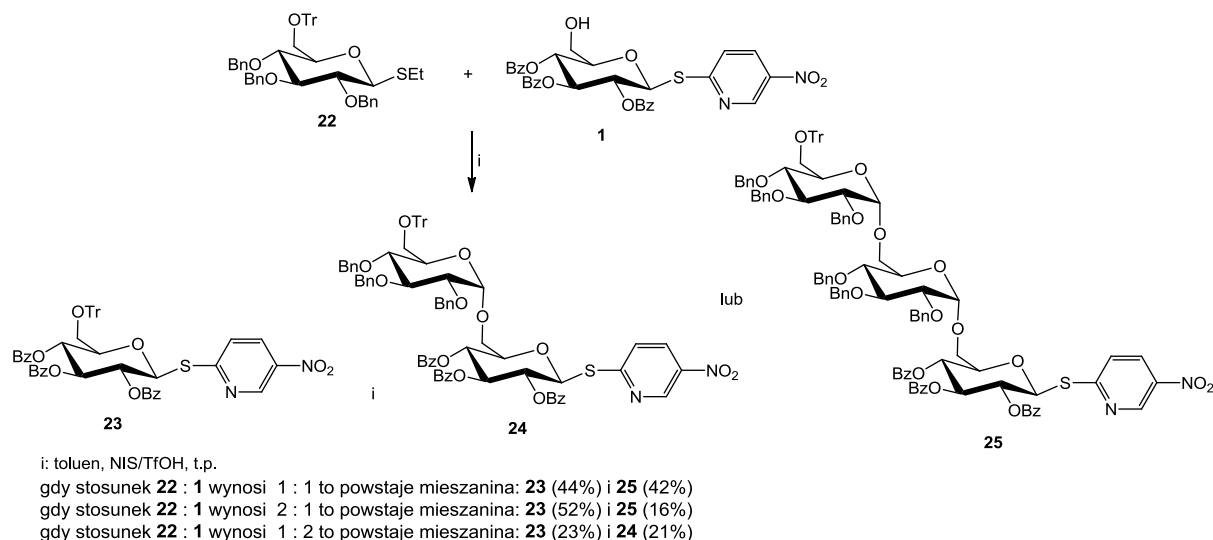
15 głównie o konfiguracji  $\alpha$ . Również w przypadku pochodnych D-glukalu **10** i **11** z dużymi grupami zabezpieczającymi powstawały produkty **20** i **21** głównie o konfiguracji  $\alpha$ .

Tabela 1

| Lp | Donor<br>glikozylowy | Promotor                           | Warunki<br>reakcji                     | Produkt | Wyd.<br>[%] | $\alpha : \beta$ |
|----|----------------------|------------------------------------|----------------------------------------|---------|-------------|------------------|
| 1  | 2                    | NIS/TfOH                           | Toluen, t.p.                           | 12      | 82          | tylko $\beta$    |
| 2  | 3                    | NIS/TfOH                           | Toluen, t.p.                           | 13      | 85          | 2 : 1            |
| 3  | 4                    | AgOTf                              | Toluen, t.p.                           | 14      | 67          | 4 : 1            |
| 4  | 4                    | AgOTf                              | Toluen, -25°C                          | 14      | 81          | 9 : 2            |
| 5  | 4                    | TMSOTf                             | Toluen, -25°C                          | 14      | 78          | 5 : 1            |
| 6  | 4                    | BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O | Toluen, t.p.                           | 14      | 94          | 6 : 1            |
| 7  | 4                    | NIS/TfOH                           | Toluen, t.p.                           | 14      | 93          | 9 : 2            |
| 8  | 4                    | IDCP                               | Toluen, t.p.                           | 14      | 92          | 3 : 2            |
| 9  | 5                    | AgOTf                              | Toluen, -25°C                          | 15      | 71          | 15 : 1           |
| 10 | 5                    | TMSOTf                             | Toluen, -25°C                          | 15      | 95          | 15 : 1           |
| 11 | 5                    | BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O | Toluen, t.p.                           | 15      | 92          | 16.5 : 1         |
| 12 | 6                    | Ag <sub>2</sub> O                  | Toluen, t.p.                           | 16      | 62          | tylko $\beta$    |
| 13 | 7                    | TMSOTf                             | CH <sub>3</sub> CN, 0°C                | 17      | 63          | tylko $\alpha$   |
| 14 | 8                    | TPHB                               | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , t.p. | 18      | 44          | 4.5 : 1          |
| 15 | 9                    | TPHB                               | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , t.p. | 19      | 86          | tylko $\alpha$   |
| 16 | 10                   | TPHB                               | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , t.p. | 20      | 68          | 95 : 5           |
| 17 | 11                   | TPHB                               | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , t.p. | 21      | 69          | tylko $\alpha$   |

Spektakularny wynik udało się osiągnąć, gdy w donorze **22**, stosowanym w reakcji glikozylacji z użyciem akceptora **1**, grupę benzyłową w pozycji C-6 zastąpiono grupą trytyłową [49 (**H12**)]. Ta rozbudowana przestrzennie grupa zdecydowania poprawia stereoselektywność reakcji glikozylacji. W tym przypadku, zamiast powstawania wcześniej obserwowanej proporcji anomerów produktu na poziomie około  $\alpha:\beta = 2:1$ , stwierdziłam powstawanie wyłącznie produktu glikozylacji o konfiguracji  $\alpha$ . Zaskoczeniem jednak jest, że zamiast oczekiwanego disacharydu powstawała mieszanina złożona ze związku **23**, będącego trytylowaną pochodną akceptora **1**, niewielkiej ilości disacharydu **24** oraz trisacharydu **25**, a proporcje tych produktów zależały od użytej w reakcji proporcji donora do

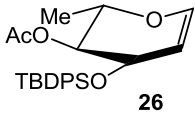
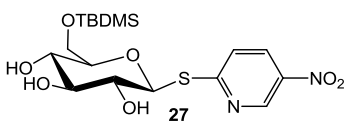
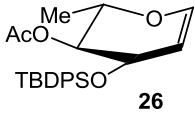
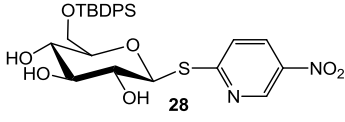
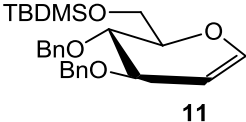
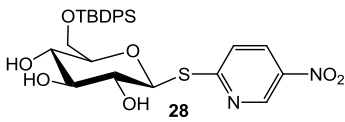
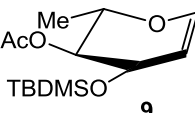
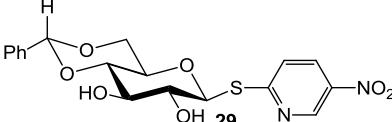
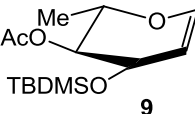
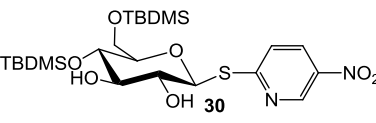
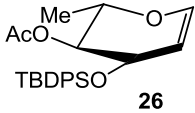
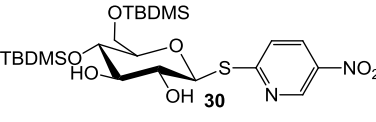
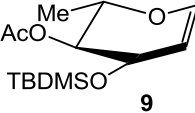
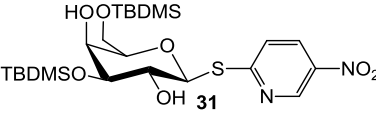
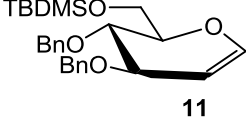
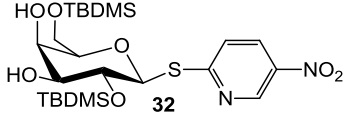
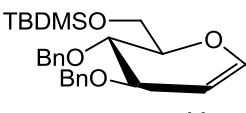
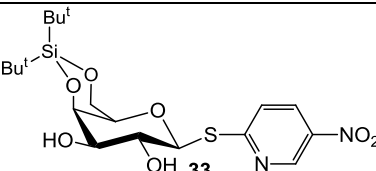
akceptora (Schemat 7). Obserwację tą można wyjaśnić równoległym zachodzeniem reakcji transestryfikacji związku **1** oraz reakcji glikozylacji.



Schemat 7. *Wpływ grupy trytylowej w pozycji C-6 donora na stereoselektywność glikozylacji z wykorzystaniem akceptora 1*

Konwencjonalne metody syntezy oligosacharydów związane są ze starannym zaplanowaniem poszczególnych etapów syntezy, mozolnym selektywnym wprowadzaniem i usuwaniem odpowiednich grup zabezpieczających, rozdziałem stereoizomerycznych produktów glikozylacji po każdym etapie i w efekcie prowadzą do uzyskania pożądanego produktu po długim czasie i z niezbyt wysoką wydajnością. Dlatego wciąż prowadzone są prace nad możliwymi sposobami uproszczenia tych procedur, często związane z próbami przeprowadzenia regioselektywnej glikozylacji. Mimo wielu doniesień literaturowych na ten temat, wciąż nie ma jednej generalnej zasady pozwalającej na przewidywanie reaktywności poszczególnych grup OH w stosowanych akceptorach glikozyłowych [50-52]. Wyniki badań nad zastosowaniem (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglukozydu w reakcjach glikozylacji jako stabilnego akceptora zachęciły mnie do przeprowadzenia dalszych eksperymentów z wykorzystaniem tego typu pochodnych, zawierających więcej niż jedną wolną grupę hydroksylową, w reakcjach regioselektywnej glikozylacji (tzw. open glycosylation) [47 (**H11**)].

Tabela 2

| Lp | Donor glikozyłowy                                                                         | Akceptor glikozyłowy                                                                      | Konfiguracja produktu | Wydajność [%] |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|
| 1  | <br>26   | <br>27   | α-(1-2)               | 2             |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 19            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-4)               | 8             |
| 2  | <br>26   | <br>28   | α-(1-2)               | 8             |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 37            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-4)               | 18            |
| 3  | <br>11   | <br>28   | α-(1-2)               | 25            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 42            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-4)               | 6             |
| 4  | <br>9   | <br>29  | α-(1-2)               | 9             |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 30            |
| 5  | <br>9  | <br>30 | α-(1-2)               | 59            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 21            |
| 6  | <br>26 | <br>30 | α-(1-2)               | 33            |
| 7  | <br>9  | <br>31 | α-(1-2)               | 40            |
| 8  | <br>11 | <br>32 | α-(1-3)               | 50            |
| 9  | <br>11 | <br>33 | α-(1-2)               | 17            |
|    |                                                                                           |                                                                                           | α-(1-3)               | 18            |

Celem tych badań było określenie wpływu rodzaju i lokalizacji grup ochronnych zarówno w donorze, jak i w akceptorze na regioselektywność reakcji glikozylacji. Jako donory glikozyłowe w reakcji Falcka-Mioskowskiego [53] wytypowałam zawierające rozbudowane

przestrzenie grupy ochronne glikale **9**, **11** i **26**, co pozwalało na stereoselektywną glikozylację prowadzącą do uzyskania tylko jednego anomerycznego produktu. Jako akceptory glikozytowe zastosowałam (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglukozę i 1-tiogalaktozydy zawierające dwie lub trzy niezabezpieczone drugorzędowe grupy hydroksylowe.

Na podstawie uzyskanych wyników (Tabela 2) można stwierdzić, że niestety regioselektywność przeprowadzonych reakcji była umiarkowana. Dla pochodnych D-glukozy z zabezpieczoną jedynie pierwszorzędową grupą w pozycji C-6 we wszystkich eksperymentach zaobserwowałam najwyższą reaktywność grupy 3-OH. Na reaktywność grup 2-OH i 4-OH wpływ miał z kolei rodzaj zabezpieczeń w donorze glikozylowym. Można jedynie stwierdzić, że zastosowanie grupy TBDPS do zabezpieczenia pozycji C-6 akceptora pozwala na uzyskanie produktów glikozylacji z wyższymi wydajnościami niż ma to miejsce przy zastosowaniu grupy TBDMS. Wynika to najprawdopodobniej ze stabilności grupy zabezpieczającej w warunkach reakcji glikozylacji.

Dla akceptorów pochodnych D-galaktozy z dwiema drugorzędowymi grupami hydroksylowymi można było stwierdzić zdecydowanie mniejszą reaktywność grupy 4-OH w porównaniu z grupami 2-OH i 3-OH. Dla pochodnych D-glukozy z dwiema grupami w pozycji 2-OH i 3-OH, ich reaktywność zależała od rodzaju zabezpieczeń w pozostałych pozycjach. W przypadku zastosowania w akceptorze zabezpieczenia benzyldenowego, większą reaktywność wykazywała grupa 3-OH, a w przypadku zabezpieczeń TBDMS zdecydowanie reaktywniejsza okazała się grupa 2-OH.

## **2. Synteza glikokoniugatów o potencjalnej aktywności biologicznej opartych na heteroaromatycznych pochodnych cukrów**

Po sprawdzeniu możliwości zastosowania wytypowanych (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów w reakcjach glikozylacji pozwalających na rozbudowę ich fragmentu cukrowego, można było przystąpić do ich wykorzystania do syntezy glikokoniugatów, które mogą wpływać na modulowanie odpowiedzi immunologicznej, regulację aktywności enzymów odpowiedzialnych za reakcje glikozylacji zachodzące w organizmie, a także wykazywać zwiększoną biodostępność.

## **2.1. Synteza glicylowanych pochodnych (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów jako potencjalnych czynników immunomodulacyjnych**

Istotnym i wciąż nie do końca rozwiązany problem jest częste występowanie posocznicy, zwanej potocznie sepsą, w trakcie hospitalizacji pacjentów na oddziałach szpitalnych, zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii. Sepsa jest zespołem objawów chorobowych występujących w odpowiedzi na czynnik infekcyjny, który najczęściej jest pochodzenia bakteryjnego. Za wywołanie sepsy odpowiedzialne są głównie, choć nie tylko, szczepy zaliczane do bakterii Gram-ujemnych [54, 55]. Najbardziej podatne na zachorowanie na sepsę są osoby z obniżoną odpornością, osoby starsze, małe dzieci czy osoby po zabiegach chirurgicznych. Dodatkowo, na większą zachorowalność wpływa zbyt częste i czasami niepotrzebne stosowanie antybiotyków, co prowadzi do uodpornienia na ich działanie wspomnianych bakterii [56]. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być wprowadzanie szczepionek powodujących u szczepionego organizmu rozwinięcie się specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko naturalnemu immunogenowi. Takie podejście stanowi możliwość zapobiegania uporczywym i ciężkim infekcjom. Profilaktyczne szczepienia mogą być wykonywane z użyciem różnych typów szczepionek, począwszy od żywych, atenuowanych mikroorganizmów, poprzez szczepionki bazujące na martwych, inaktywowanych patogenach, szczepionki bazujące na inaktywowanych toksynach wyizolowanych z konkretnych patogenów, szczepionki oparte o interferujące RNA czy przeciwciała monoklonalne. Znane są również szczepionki składające się z polisacharydów otoczkowych oraz szczepionki glikokoniugatowe, w których część cukrowa wiązana jest z białkiem nośnikowym [17, 18, 57].

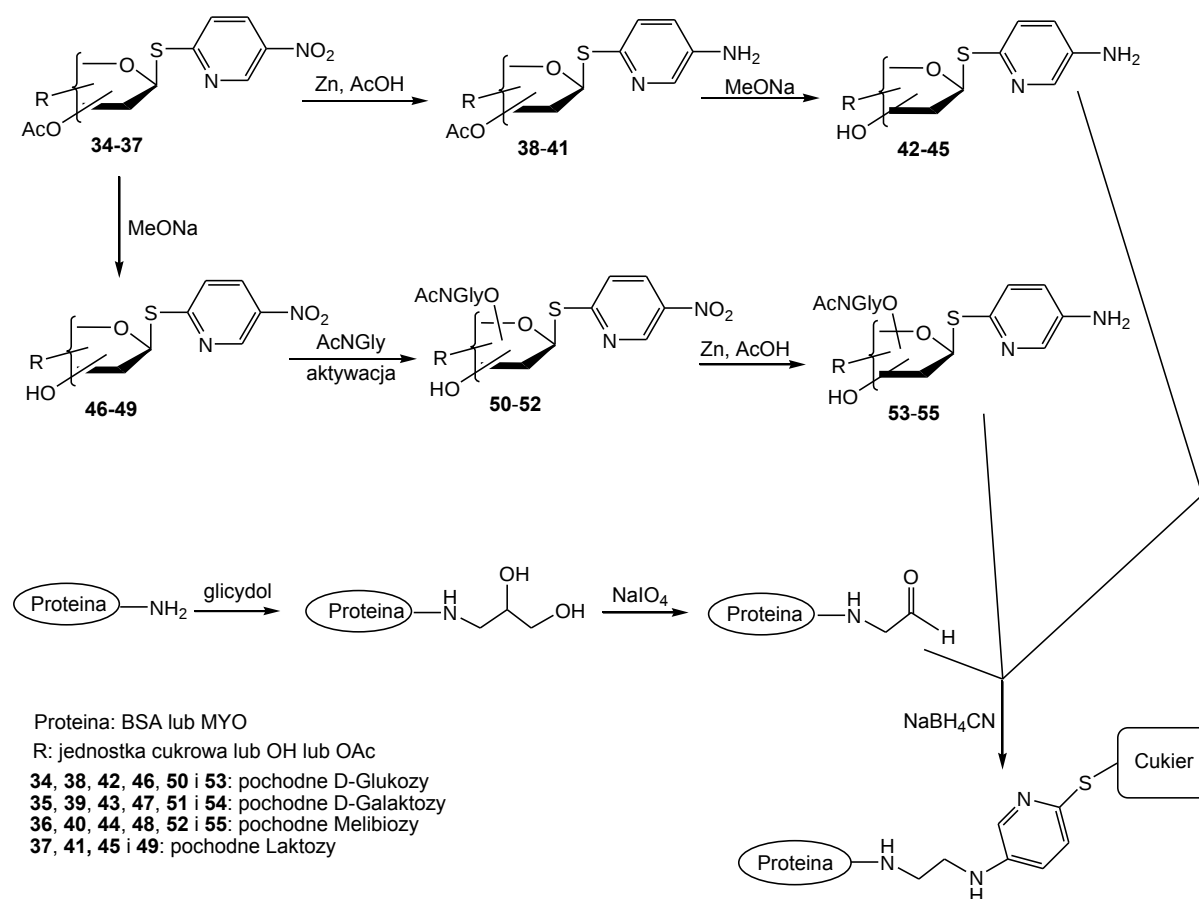
Wiele czynników pochodzenia bakteryjnego, w tym w dużej mierze lipopolisacharyd (LPS), jest zdolnych do stymulowania reakcji układu immunologicznego zainfekowanego organizmu [58]. LPS odgrywa znaczącą rolę w patogenezie sepsy i wstrząsu septycznego. Liczne badania potwierdziły obecność glicyny związanej estrowo w rdzeniu oligosacharydowym lipopolisacharydów z różnych bakterii, który to fragment warunkuje immunogenność LPS [59]. Lokalizacja glicyny jest trudna do wyjaśnienia ze względu na dużą labilność wiązania estrowego w trakcie izolacji LPS z materiału biologicznego. Aby wyjaśnić funkcję glicyny, związanej estrowo z fragmentem cukrowym, podczas infekcji bakteryjnej, a także sprawdzić, czy fragment taki jest odpowiedzialny za wywołanie odpowiedzi immunologicznej organizmu postanowiono otrzymać na drodze syntezy chemicznej

glicylowaną pochodną cukrową, połączyć ją z białkiem nośnikowym i sprawdzić jej aktywność biologiczną. Połączenie pochodnej cukrowej z białkiem nośnikowym wydawało się konieczne, jako że stosowane wcześniej szczepionki oligosacharydowe nie były w stanie wywołać pamięci immunologicznej, nawet jeśli były stosowane w obecności adiuwantów [60]. Dopiero zastosowanie szczepionek glikokoniugatowych, w których obecne było białko pozwalało na wywołanie trwałej odpowiedzi immunologicznej.

W przeprowadzonych eksperymentach jako białko nośnikowe wytypowano monomeryczną albuminę wołową (BSA) oraz końską mioglobinę (MYO), które łączone były z otrzymanymi glicylowanymi pochodnymi cukrów poprzez odpowiednio dobrany łącznik, w tym przypadku łącznik zawierający ugrupowanie formylowe. Zaprojektowane koniugaty miały posłużyć do otrzymania surowic zwierzęcych, z których da się wydzielić swoiste przeciwciała względem zaprojektowanych antygenów zawierających epitop glicylowy.

Początkowo testowałam możliwe warianty glicylowania cukru z użyciem Z-glicyny oraz symetrycznego bezwodnika BOC-glicyny jako czynników acylujących na prostych modelach jakimi były metylo  $\alpha$ -D-glukopiranozyd oraz metylo  $\alpha$ -D-galaktopiranozyd. W przypadku pochodnej D-galaktozy uzyskano głównie produkt podstawiony w pozycji C-6, podczas gdy dla pochodnej D-glukozy uzyskiwano mieszaninę produktów podstawionych w pozycji C-3 oraz C-6. Struktury uzyskanych w poszczególnych reakcjach produktów potwierdzano na podstawie interpretacji dwuwymiarowych widm korelacyjnych NMR [61].

Do badań zasadniczych wytypowałam (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydy pochodne takich cukrów jak glukoza, galaktoza, melibioza czy laktoza. Pochodne te wybrałam ze względu na obecność atomu siarki zamiast tlenu w pozycji anomerycznej cukru, co pozwoli na zwiększenie stabilności uzyskanych glikokoniugatów wobec hydrolizy enzymatycznej. Dodatkowo, obecność grupy nitrowej pozwala na łatwe jej przekształcenie do ugrupowania aminowego, poprzez które może nastąpić połączenie uzyskanej glicylowanej pochodnej cukrowej z białkiem nośnikowym (Schemat 8).



Schemat 8. Synteza glicylowanych pochodnych (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów i ich łączenie z białkiem nośnikowym

(5-Nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydy **34-37** można przeprowadzić w (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydy poprzez redukcję grupy nitrowej w aglikonie z wykorzystaniem opisanej przez Roya [24] procedury z użyciem pyłu cynkowego i kwasu octowego, a następnie usunąć zabezpieczenia acetylowe z uzyskanych związków **38-41** w środowisku zasadowym z użyciem metanolewego roztworu metanolanu sodu, co pozwala na otrzymanie związków **42-45**. Można również najpierw przeprowadzić de-O-acetylowanie tioglikozydów **34-37** pozwalające na uzyskanie pochodnych **46-49** będących substratami w reakcji estryfikacji z *N*-acetyloglicyną. Estryfikację grup hydroksylowych w pochodnych cukrów **46-49** prowadziłam z użyciem 1 ekwiwalenta molowego *N*-acetyloglicyny w stosunku do acylowanej pochodnej cukru, a aktywację grupy karboksylowej przeprowadziłam w obecności kilku różnych czynników kondensujących, spośród których najlepiej sprawdził się układ DCC/DMAP. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań modelowych na metylo *O*-glikozydach, tak i w tym przypadku, dla pochodnych zawierających cząsteczkę D-galaktozy z wolną grupą

6-OH estryfikacja zachodziła głównie w tej pozycji (zarówno dla pochodnej monosacharydu **47**, jak i dla pochodnej melibiozy **48**). W przypadku estryfikacji pochodnej D-glukozy **46** obserwowałam powstawanie mieszaniny produktów zestryfikowanych w pozycji 3-OH lub 6-OH. W ten sposób stworzone koniugaty imitowały wspólne epitopy w endotoksynach bakteryjnych (Schemat 8) [62 (**H8**)]. Pochodnych **42-45** nie poddałam reakcji z glicyną, gdyż wówczas acylowaniu ulegałaby przede wszystkim grupa aminowa w aglikonie tioglikozydów, a to uniemożliwiałoby dalsze ich łączenie z białkiem nośnikowym. Pochodne te otrzymałam po to, aby można było porównać aktywność koniugatów z fragmentem cukrowym zestryfikowanych glicyną z analogicznymi koniugatami nie zawierającymi reszty glicyny.

Uzyskane (5-amino-2-pirydylo) 1-tio- $\beta$ -D-glikozydy, zarówno zestryfikowane *N*-acetyloglicyną, jak i całkowicie odbezpieczone przekazałam do Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu, gdzie skoniugowano je z białkami nośnikowymi BSA oraz MYO (Schemat 8), a następnie przeprowadzono badania mające na celu określenie ich immunoreaktywności. Na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem surowicy króliczej, otrzymanej poprzez szczepienie królików koniugatem BSA z *N*-acetylowanym oligosacharydem rdzeniowym *Escherichia coli* K-12 C600, stwierdzono że immunoreaktywność koniugatów pochodnych disacharydów jest niższa niż w przypadku koniugatów pochodnych monosacharydów. Zestryfikowana glicyną pochodna D-glukozy jest nieco bardziej immunoreaktywna niż zestryfikowana glicyną pochodna D-galaktozy. Duże znaczenie dla immunoreaktywności ma również rodzaj białka nośnikowego. Lepsza w tym przypadku okazała się mioglobina końska.

Przeprowadzono również ocenę właściwości genotoksycznych i cytotoksycznych otrzymanych koniugatów i stwierdzono, że nie indukowały one uszkodzeń chromosomów a także nie indukowały śmierci komórek w wyniku apoptozy.

Po potwierdzeniu ich immunoreaktywności, koniugaty białkowe zawierające *N*-acetyloglicylované pochodne (5-amino-2-pirydylo) 1-tio- $\beta$ -D-glikozydów zastosowano do immunizacji myszy w celu uzyskania antykoniugatowych przeciwciał monoklonalnych. W efekcie uzyskano siedem przeciwciał monoklonalnych immunoreaktywnych z lipopolisacharydami szczepów: *Escherichia coli* K-12 PCM 2531, *Hafnia alvei* PCM 1196 i *Shigella sonnei* FII [62 (**H8**), 63].

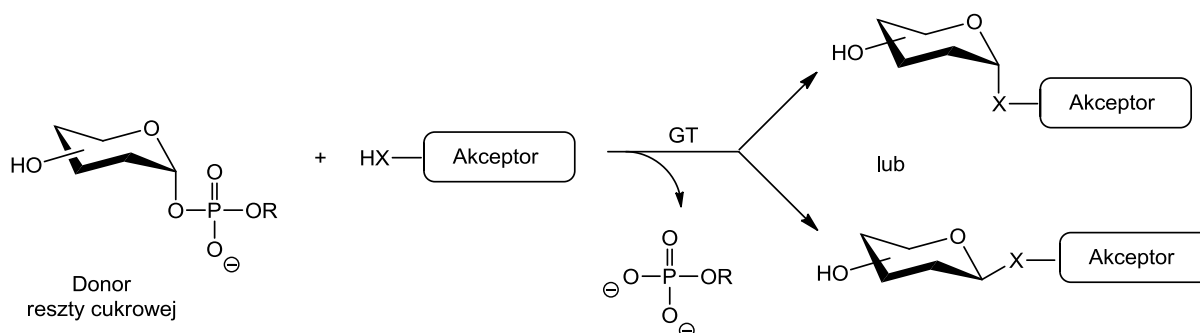
Uzyskane wyniki pozwalają żywić nadzieję, że w przyszłości uda się opracować szczepionkę glikokoniugatową o szerokiej swoistości wobec endotoksyn bakteryjnych. Dodatkowo, otrzymane przeciwciała mogą być zastosowane do wykrywania antygenów

obecnych w surowicy pacjentów, co może pozwolić na szybkie zdiagnozowanie ciężkiego zakażenia bakteryjnego u tych pacjentów.

## **2.2. Synteza glikokoniugatów zawierających fragment urydynowy jako inhibitorów glikozylotransferaz**

Kolejnym etapem badań była synteza glikokoniugatów, potencjalnych inhibitorów GTs, które dzięki założonej aktywności biologicznej mogłyby wpływać na kontrolę licznych procesów chorobowych związanych z infekcjami wirusowymi i bakteryjnymi, a także na kontrolę rozwoju niektórych nowotworów, w przypadku których stwierdzono nadekspresję enzymów z tej grupy.

W komórkach organizmów żywych glikozylacja zachodzi w obecności wysoce specyficznych enzymów z grupy GTs (opisanych jako EC 2.4.x.y), które przenoszą w sposób regio- i stereoselektywny zaktywowany fragment cukrowy od cząsteczki donora do cząsteczki akceptora posiadającego najczęściej wolną grupę hydroksylową lub aminową (polisacharyd, lipid, białko, metabolit wtórny lub DNA) [64-66]. Znacznie rzadziej transfer cukru może zachodzić na atom siarki z utworzeniem wiązania S-glikozydowego (tioglikozydy roślinne) lub na nukleofil węglowy z utworzeniem wiązania C-glikozydowego (glikozydowe antybiotyki). Donor reszty cukrowej zawiera zwykle jako grupę odchodzącą w pozycji anomerycznej podstawioną resztę fosforanową (Schemat 9).



Schemat 9. Reakcja glikozylacji katalizowana przez GTs

Aktywowany donor reszty cukrowej występuje najczęściej w postaci nukleotydów cukrowych (mono- lub difosforanów np. UDP-Gal lub CMP-NeuAc) ale może też występować w postaci fosforanów lipidowych (np. pochodne cukrowe fosforanu dolicholu)

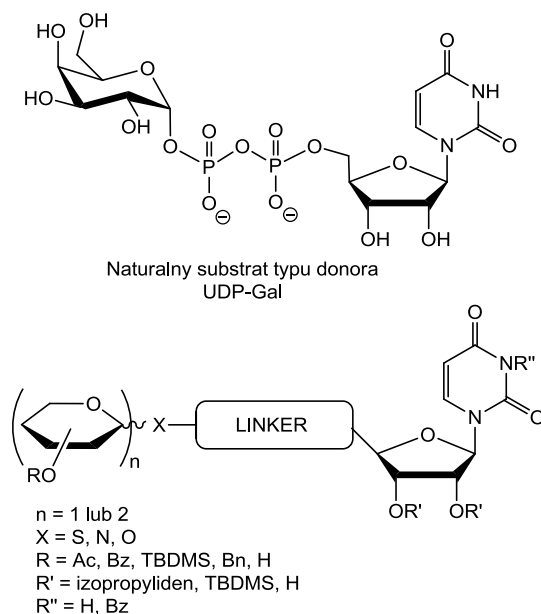
lub niepodstawionych fosforanów cukrowych [67]. Glikozylotransferazy zależne od nukleotydów cukrowych nazywane są glikozylotransferazami szlaku Leloir.

W ostatnich latach opisano wiele prac zmierzających do uzyskania skutecznych i selektywnych inhibitorów GTs [7-9, 11, 68-71]. Podczas projektowania opisanych struktur najczęściej brano pod uwagę podobieństwo do naturalnych substratów GTs. Tak więc projektowane inhibitory to zwykle analogi typu donora, analogi typu akceptora lub analogi stanu przejściowego reakcji enzymatycznej. Inhibitory takie powinny charakteryzować się stałą inhibicji na poziomie  $K_M$  naturalnego substratu. Analogi typu donora powinny w swojej strukturze zawierać trzy elementy składowe:

- część cukrową
- nukleozyd (najczęściej urydynę) odpowiadający za wiązanie z białkiem enzymatycznym oraz
- łącznik (najczęściej reszta mono- lub difosforanu), który zdolny jest do wiązania jonów metali obecnych w centrum aktywnym enzymu.

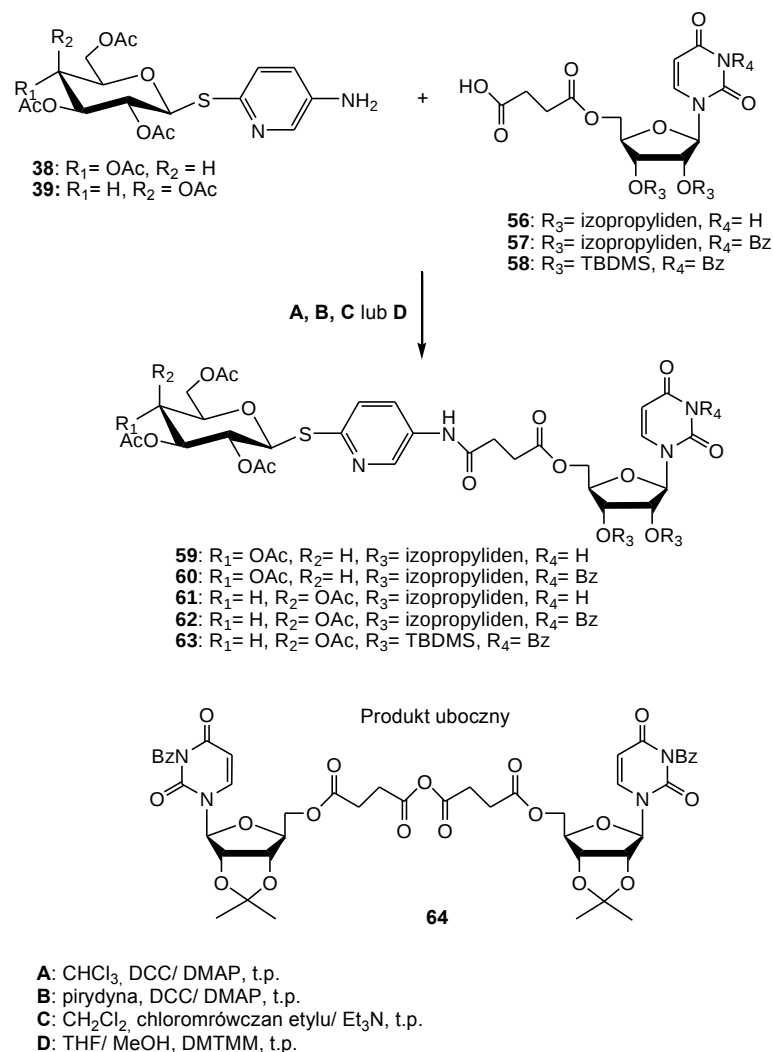
Modyfikacje strukturalne w analogach substratów typu donora mogą być wprowadzane w każdym z tych elementów składowych z osobna lub jednocześnie. Do przykładowych modyfikacji można zaliczyć zastępowanie egzocyklicznego atomu tlenu innym heteroatomem (N lub S) lub atomem węgla w celu zwiększenia odporności na hydrolizę enzymatyczną, zastąpienie tlenu w pierścieniu cukrowym węglem lub azotem, podstawienie jednej lub kilku grup hydroksylowych w cukrze wodorem lub fluorem czy metylowanie grup hydroksylowych w cukrze [11]. Wiele modyfikacji dotyczy łącznika fosforanowego poprzez zastosowanie linkerów takich jak pochodne kwasu malonowego lub winowego [31], pierścienie heterocykliczne (triazol, pirydyna) [68, 72, 73] czy jednostki cukrowe [31, 32, 74]. Jednak tylko nieliczne z tych opisanych pochodnych wykazywały znaczące właściwości hamujące aktywność GTs w ilościach mikromolowych.

Celem prac prezentowanych w niniejszym opracowaniu było otrzymanie związków zdolnych do hamowania wybranego enzymu z grupy GTs, a mianowicie  $\beta$ 1,4-GalT, będących analogami naturalnego substratu typu donora, którym jest UDP-Gal (Schemat 10).



Schemat 10. *Ogólna struktura analogów UDP-Gal*

Przy projektowaniu inhibitorów GTs będących analogami substratu typu donora należy pamiętać, że powinny charakteryzować się one dobrym powinowactwem do enzymu, mieć zdolność do przenikania przez błony biologiczne aby móc dotrzeć do celu znajdującego się wewnątrz komórki oraz działać na wybrane enzymy. Patrząc na strukturę UDP-Gal zauważa się anionowy charakter łącznika difosforanowego, który w przypadku syntezy inhibitorów zawierających ten element strukturalny wyklucza możliwość ich wniknięcia do komórki ze względu na niekorzystne oddziaływanie z dwuwarstwą fosfolipidową. Dlatego, do stosowania tych związków *in vivo*, korzystne wydaje się zastąpienie ugrupowania difosforanowego linkerem zawierającym heteroatomy z wolnymi parami elektronowymi zdolne do oddziaływania z jonem metalu obecnym w centrum aktywnym enzymu. Tak więc w syntezowanych glikokoniugatach fragment urydynowy łączyłam z cukrem za pomocą pozbawionych ładunku linkerów zawierających heteroatomy oraz najczęściej układy heteroaromatyczne. Dla poprawy stabilności tych glikokoniugatów wobec enzymów z grupy glikozylohydrolaz, w większości z nich zastąpiłam tlen przy węglu anomerycznym atomem siarki lub azotu. Dołączany poprzez linker fragment cukrowy stanowiły mono- lub disacharydy, w tym również zawierające jednostki deoksycukrów. W większości glikokoniugatów jednostka cukrowa łączona z linkerem miała konfigurację  $\beta$  na centrum anomerycznym (Schemat 10).

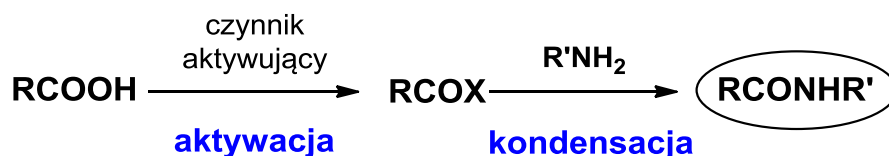


Schemat 11. Synteza glikokoniugatów 59-63

Do syntezy pierwszych glikokoniugatów urydynowych wykorzystałam per-*O*-acetylowane (5-amino-2-pirydylo) 1-tio-β-*D*-glikozydy pochodne *D*-glukozy **38** i *D*-galaktozy **39**. Dzięki obecności grupy aminowej w aglikonie można je połączyć z wykorzystaniem linkera bursztynowego z odpowiednio zabezpieczonymi pochodnymi urydyny **56-58**. Dobór grup zabezpieczających w urydynie nie był przypadkowy bo miały one zabezpieczyć przed powstawaniem regioizomerów oraz zapewnić rozpuszczalność związków w stosowanych do reakcji rozpuszczalnikach. Zabezpieczenia te powinny dać się usunąć z finalnych glikokoniugatów bez naruszania utworzonych we wcześniejszych etapach wiązań. Jeśli chodzi o zabezpieczenia acetylowe w tioglikozydach, to zakładałam że poprawią one transport przez błony biologiczne podczas badań biologicznych, a obecne w komórkach lipazy usuną te grupy po wnikięciu glikokoniugatów do wnętrza komórki. Linker bursztynowy

wytypowałam bazując na doniesieniach literaturowych mówiących o jego zdolności do koordynowania dwuwartościowych jonów metali [75, 76]. Linker ten wprowadzałam poprzez acylowanie grupy 5'-OH urydyny bezwodnikiem bursztynowym przy jednoczesnym zabezpieczeniu grup 2'-OH i 3'-OH urydyny oraz opcjonalnym zabezpieczeniu atomu azotu N<sup>3</sup> w pierścieniu uracylowym. Sprzęganie pochodnych urydyny z (5-amino-2-pirydylo) 1-tio-β-D-glikozydami prowadzące do uzyskania glikokoniugatów **59-63** następowało poprzez utworzenie wiązania amidowego w wyniku reakcji grupy aminowej w aglikonie tioglikozydów z grupą karboksylową w linkerze bursztynowym (Schemat 11) [77 (**H10**)].

Otrzymanie wiązania amidowego na drodze bezpośredniej reakcji aminy z kwasem karboksylowym jest zadaniem trudnym i zachodzi dopiero w wysokiej temperaturze (160-180°C), co może prowadzić do powstawania produktów ubocznych. Reaktywniejszą pochodną kwasu karboksylowego można uzyskać stosując tzw. „czynniki kondensujące” (Schemat 12) pozwalające na przyłączenie elektronoakceptorowej grupy odchodzącej do acylowanego atomu węgla [78].



Schemat 12. Tworzenie wiązania amidowego w reakcji aminy z kwasem karboksylowym

Spośród licznych, handlowo dostępnych czynników kondensujących wymienić można karbodiimidy [79], stosowane jako jedne z pierwszych czynników kondensujących same, albo z dodatkami takimi jak HOBt [80] lub DMAP [81]. Karbodiimidy reagują z kwasem z utworzeniem O-acyloizomocznikowej pochodnej, która może już ulegać reakcji z aminą (tworząc amid) lub z drugą cząsteczką kwasu (tworząc symetryczny bezwodnik). Można również wygenerować mieszany bezwodnik z wykorzystaniem chloromrówczanu alkilowego, który jest reaktywnym czynnikiem acylującym [82]. Do aktywacji kwasów karboksylowych w reakcjach z aminami mogą również służyć czynniki kondensujące tworzące w mieszaninie reakcyjnej tzw. „superaktywne estry”. Kamiński wykazał efektywność 2-chloro-4,6-dipodstawionych-1,3,5-triazyn w tworzeniu wiązania amidowego [83]. Reakcje tego typu wymagają obecności trzeciorzędowych amin w środowisku reakcji, a najlepsze wyniki uzyskano stosując N-metylomorfolinę (NMM) [84]. Można też wygenerować czynnik kondensujący jakim jest chlorek 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyno-2-yl)-4-metylomorfoliny

(DMTMM) poprzez zmieszanie w THF równomolowych ilości NMM i 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (CDMT). Tak uzyskany czynnik kondensujący może być wydzielony przez proste sączenie, przechowywany przez dłuższy czas i używany do syntezy wiązań estrowych oraz amidowych. DMTMM może, w zależności od użytego do reakcji kondensacji rozpuszczalnika, ulegać demetylacji tracąc tym samym aktywność. Badania wykazały, że najmniejsze ilości produktu demetylacji powstają wtedy, gdy rozpuszczalnikiem stosowanym do kondensacji będzie THF lub metanol [85].

Do utworzenia glikokoniugatu w reakcji pomiędzy związkami **38** i **57** zastosowałam początkowo układ DCC/DMAP w chloroformie lub w pirydynie. Niestety, w przypadku użycia chloroformu obserwowałam powstawanie jedynie niewielkich ilości glikokoniugatu **60**, natomiast głównym produktem był symetryczny bezwodnik **64** utworzony z dwóch cząsteczek pochodnej urydyny **57** (Schemat 11). Zmiana rozpuszczalnika na pirydynę pozwoliła na uzyskanie glikokoniugatu **59** z nieco lepszą wydajnością, ale za to obserwowałam zachodzącą w trakcie reakcji deprotekcję azotu uracylowego. Taka sama sytuacja miała miejsce, gdy próbowałam skoniugować (5-amino-2-pirydylo) 1-tiogalaktozyd **39** z pochodną urydyny **57**. Powstawał wówczas z niską wydajnością glikokoniugat **61** z odbezpieczonym azotem uracylowym. Z kolei zastosowanie jako substratu pochodnej urydyny **56**, nie mającej zabezpieczonego azotu w pierścieniu uracylowym, pozwoliło na uzyskanie jedynie śladowych ilości produktu **59**. W przypadku zastosowania pochodnej urydyny **58** z sililowymi grupami zabezpieczającymi we fragmencie rybozy w reakcji z pochodną glukozy **38** stwierdziłam, że w powstałym glikokoniugacie **63** azot uracylowy nadal jest zabezpieczony.

Niskie wydajności uzyskanych glikokoniugatów spowodowały, że konieczne było przetestowanie innych warunków reakcji kondensacji. Postanowiłam wygenerować mieszaną bezwodnik jako aktywny czynnik acylujący grupę aminową w aglikonie 1-tioglukozydu **38** i dla reakcji z pochodnymi urydyny **57** i **58** zastosowałam chloromrówczan etylowy w obecności trietyloaminy jako zasady wyłapującej wytworzony chlorowódor. W tym przypadku uzyskałam odpowiednio glikokoniugaty **60** i **63**, w których benzoilowa grupa zabezpieczająca azot imidowy w pierścieniu uracylowym okazała się wystarczająco stabilna w warunkach reakcji. Najlepsze wyniki uzyskałam jednak stosując DMTMM jako czynnik kondensujący. Reakcję kondensacji (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydów **38** i **39** z pochodnymi urydyny **56–59** prowadziłam w THF z dodatkiem metanolu, który poprawiał rozpuszczalność DMTMM stosowanego w ilości równomolowej w stosunku do substratów. W każdej reakcji uzyskałam oczekiwany produkt z zadowalającą wydajnością. W warunkach

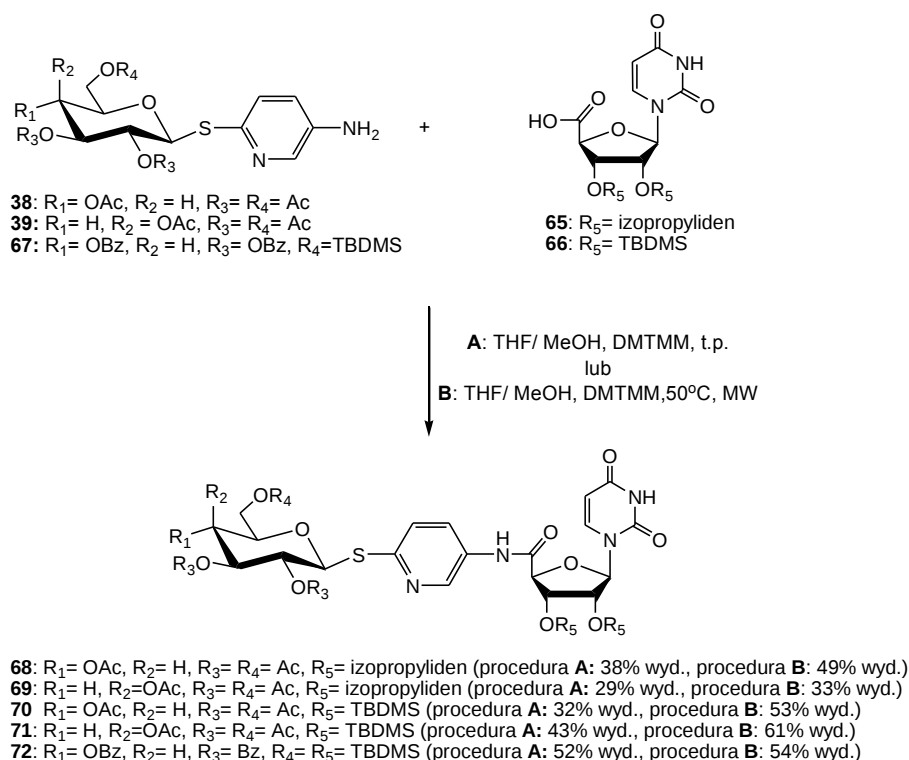
tych nie obserwowałam deprotekcji azotu imidowego w powstających glikokoniugatach. Dodatkowo okazało się, że zabezpieczanie atomu azotu w substracie urydynowym nie jest konieczne, co potwierdzają zbliżone wydajności glikokoniugatów uzyskanych przy zastosowaniu obu izopropylidenowych pochodnych urydyny **56** i **57**. Dlatego, do syntezy kolejnych glikokoniugatów stosowałam już tylko wariant aktywacji z użyciem DMTMM.

Aby sprawdzić, czy linker bursztynowy wprowadzony w syntezy glikokoniugatów w miejsce ugrupowania difosforanowego, obecnego w naturalnym substracie GTs, ma istotny wpływ na aktywność biologiczną uzyskanych związków, otrzymałam serię związków pozbawionych tego linkera. W związkach tych ugrupowanie aminowe w aglikonie (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydów połączono bezpośrednio z grupą karboksylową utlenionych w pozycji C-5' pochodnych urydyny **65** i **66** [86 (**H2**)].

W literaturze opisano wiele metod pozwalających na utlenienie alkoholi do kwasów karboksylowych. Część z opisanych metod zastosowano również do utlenienia pozycji C-5' w nukleozydach. Dobre wydajności uzyskiwano stosując  $H_5IO_6/CrO_3$  jako układ utleniający [87]. Jednak ze względu na możliwość zanieczyszczenia produktu śladowymi ilościami chromu, który mógłby zafałszować wyniki badań aktywności biologicznej finalnych glikokoniugatów, postanowiłam zrezygnować z tej metody na rzecz utleniania układem TEMPO/BAIB [88]. W metodzie tej aktywnym utleniaczem jest sól *N*-oksoamoniowa tworząca się w wyniku dysproporcjonowania *N*-tlenku 2,2,6,6-tetrametylopiperydyny (TEMPO), który stosowany jest w ilościach katalitycznych. Z kolei [bis(acetoksy)-jodo]benzen (BAIB) jest stosowany w ilości stechiometrycznej ponieważ konieczny jest jako czynnik regenerujący TEMPO na drodze utleniania jego pochodnej hydroksyloaminowej. W literaturze opisano zastosowanie tej metody do utleniania adenozyiny, urydyny, cytozyny i guanozyiny. Jest to metoda łagodna i skuteczna, a przede wszystkim pozwala na uzyskanie utlenionych pochodnych urydyny **65** i **66** z dobrymi wydajnościami.

Łączenie fragmentów mających tworzyć glikokoniugaty poprzez wiązanie amidowe prowadziłam z wykorzystaniem DMTMM jako czynnika kondensującego. Ponieważ przy syntezie glikokoniugatów **59–63** czas reakcji w temperaturze pokojowej był stosunkowo długi (48 h), postanowiłam spróbować skrócić go poprzez zastosowanie promieniowania mikrofalowego, które stanowi alternatywną metodę w stosunku do kondensacji wysokotemperaturowej. Zastosowanie ogrzewania mikrofalowego skraca czas reakcji chemicznej, ogranicza zachodzenie reakcji ubocznych, zwiększa wydajność uzyskiwanych amidów oraz poprawia powtarzalność reakcji [89]. W literaturze opisano zastosowanie

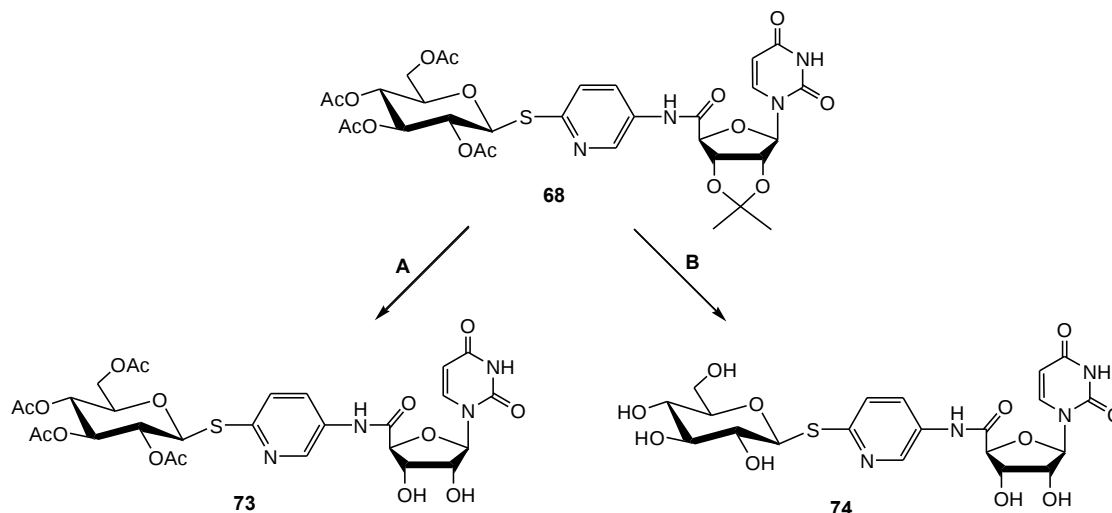
do reakcji prowadzonej w polu mikrofal czynnika kondensującego opartego na triazynie z przeciwjonem tetrafluoroboranowym. Warunki takie zostały zastosowane do syntezy wiązania amidowego w *N*-glikozylowanych aminokwasach. Reakcję kondensacji prowadzono w polu mikrofal (100 W) w temperaturze 70°C i uzyskano oczekiwany produkt w czasie 5 minut z wydajnością 80% [90].



Schemat 13. Synteza glikokoniugatów **68-72**

Opisane wyniki skłoniły mnie do zastosowania promieniowania mikrofalowego do otrzymania glikokoniugatów w reakcji pomiędzy utlenionymi pochodnymi urydyny **65–66** i (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydami **38, 39** i **67** prowadzonej z wykorzystaniem DMTMM jako czynnika kondensującego. Pochodną **67** uzyskałam poprzez redukcję grupy nitrowej w aglikonie (5-nitro-2-pirydylo) 2,3,4-tri-*O*-benzoilo-6-*O*-*tert*-butylodimetylosililo-1-tio-β-*D*-glukopiranozydu, który był półproduktem w syntezie akceptora **1**, a warunki redukcji były analogiczne jak podczas otrzymywania pochodnych **38** i **39**. Dzięki zastosowaniu promieniowania mikrofalowego, glikokoniugaty **68–72** uzyskałam prowadząc reakcję zdecydowanie krócej niż w przypadku reakcji prowadzonych w temperaturze pokojowej na mieszkadle magnetycznym. Do tego obserwowano nieco wyższe wydajności produktu niż w przypadku prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej (Schemat 13).

Dodatkowo, aby sprawdzić wpływ obecności grup zabezpieczających na wykazywaną aktywność biologiczną, usunęłam te grupy z glikokoniugatu **68** w sposób selektywny, uzyskując pochodną **73** lub też całkowicie, co pozwoliło na otrzymanie glikokoniugatu **74** (Schemat 14) [86 (**H2**)].



A: MeOH/H<sub>2</sub>O, Amberlyst 15, 70°C, 2h

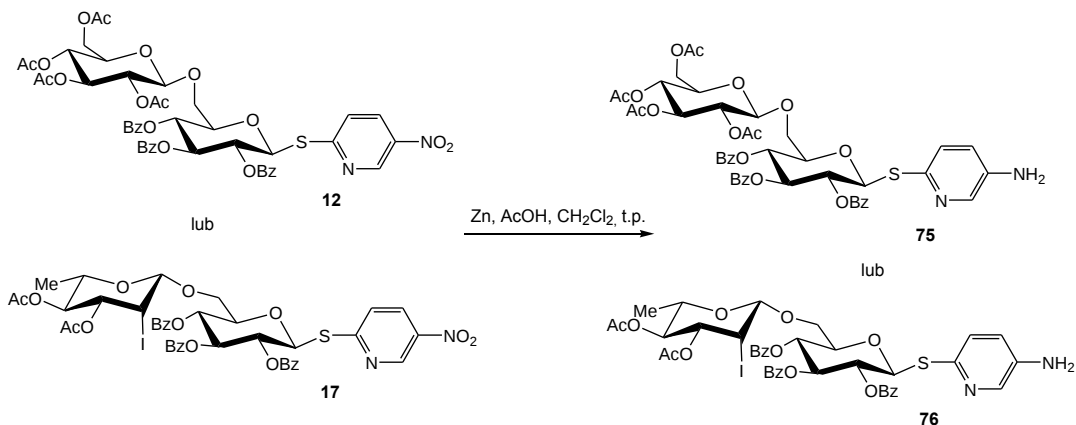
B: 1. MeOH, MeONa, t.p. 1h, 2. MeOH/H<sub>2</sub>O, Amberlyst 15, 70°C, 2h

Schemat 14. *Selektywna lub całkowita deprotekcja glikokoniugatu 68*

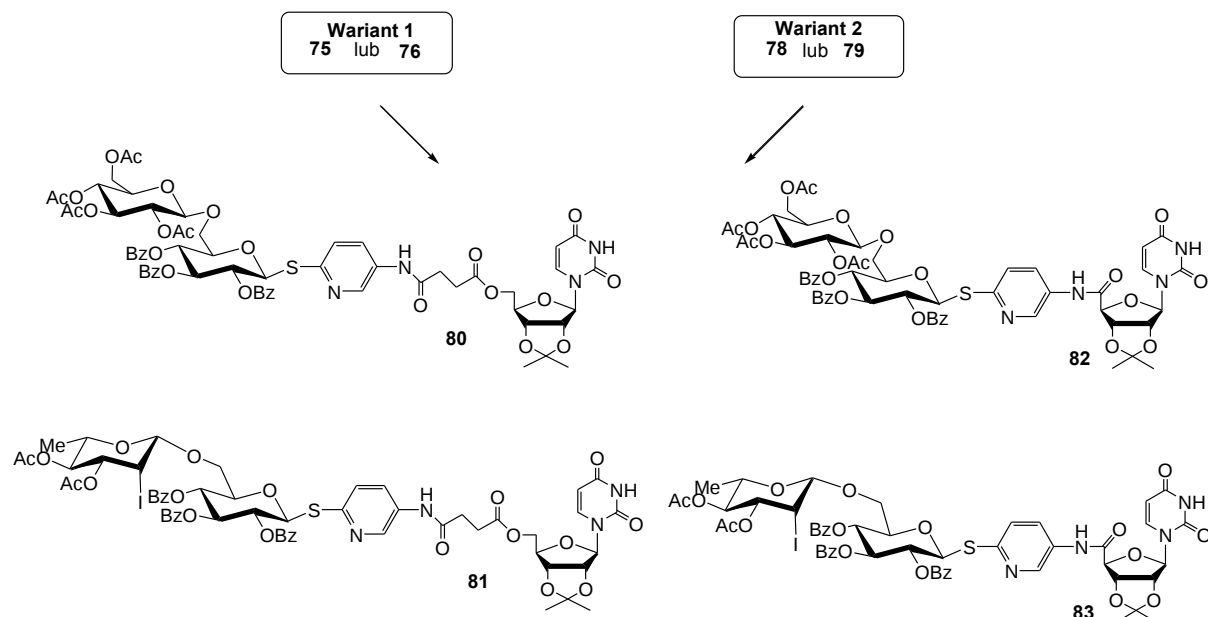
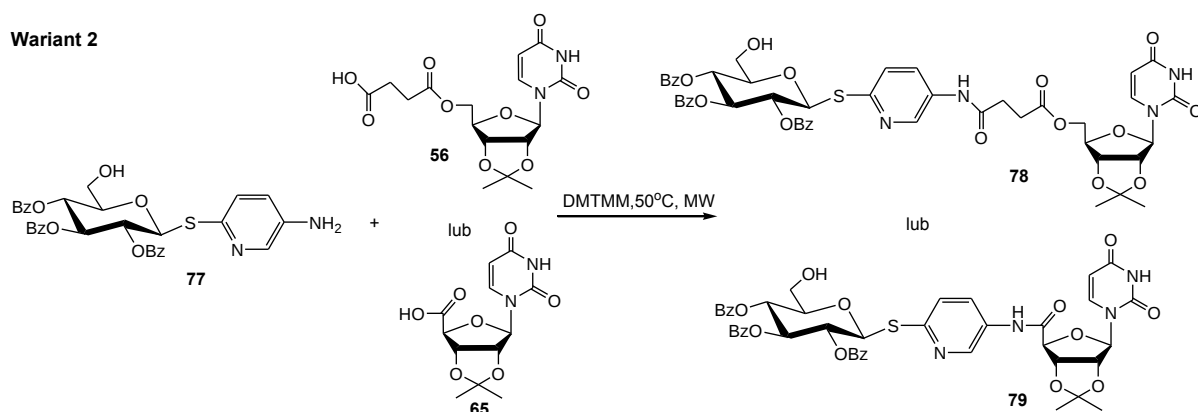
W kolejnym etapie postanowiłam rozbudować fragment cukrowy glikokoniugatów wykorzystując fakt, że pochodne (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydu okazały się akceptorami bardzo stabilnymi w reakcji glikozylacji. Miało to na celu uzupełnienie dotychczasowej biblioteki związków o pochodne, które pozwoliłyby na ocenę wpływu wielkości i struktury fragmentu cukrowego na finalną aktywność glikokoniugatów.

Do jednostki glukozy dotychczas obecnej w uzyskanych glikokoniugatach postanowiłam dołączyć wiązaniem 1,6-glikozydowym kolejną jednostkę cukrową. Wybór padł na drugą cząsteczkę D-glukozy lub na 2-jodo-2,6-dideoksy-L-mannozę, tak aby uzyskać zarówno wiązanie  $\beta$ -1,6-glikozydowe, jak i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe. Jako donory glikozyłowe wybrałam, stosowane już we wcześniej opisanych reakcjach, metylo tetra-O-acetylo-1-tio- $\beta$ -D-glukopiranozyd **2** oraz 3,4-di-O-acetylo-2-jodo-2,6-dideoksy-1-O-tert-butyldimetylosililo- $\alpha$ -L-mannopiranozyd **7**.

**Wariant 1**



**Wariant 2**



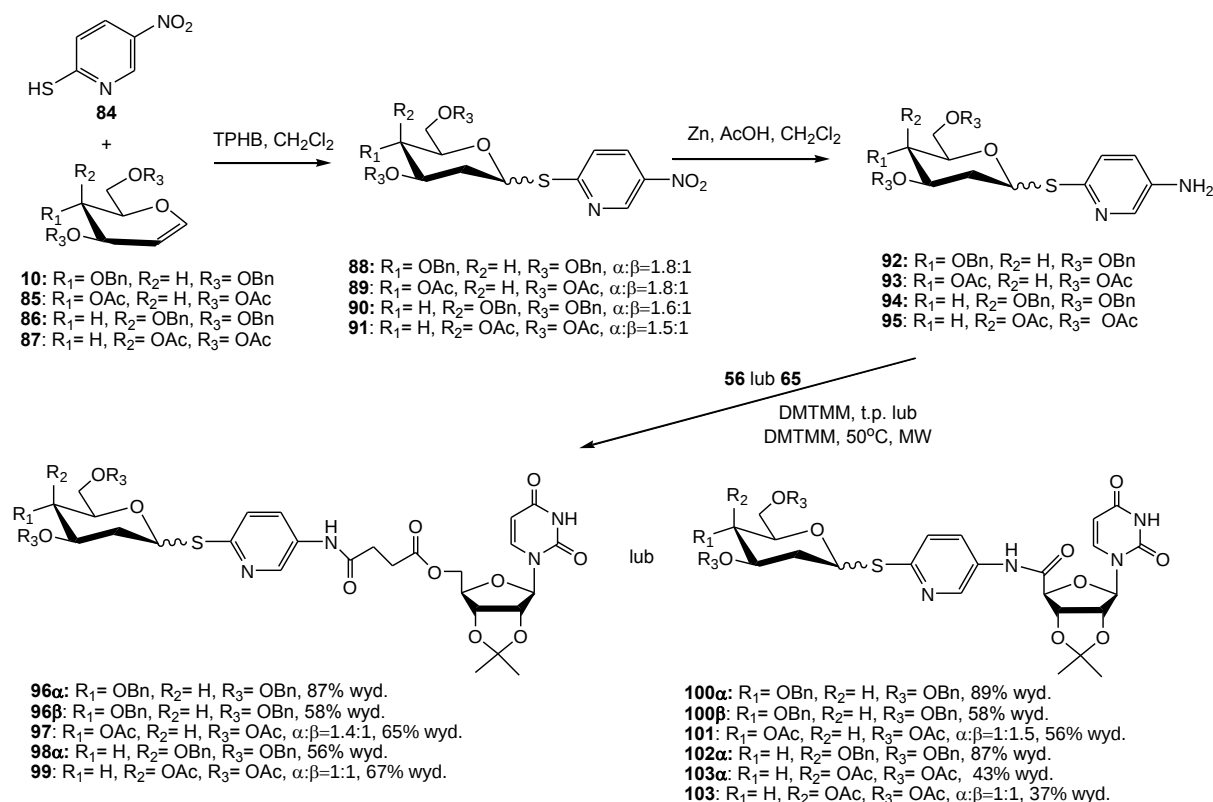
**Schemat 15. Rozbudowa fragmentu cukrowego glikokoniugatów**

Do syntezy finalnych glikokoniugatów można podejść w dwojaki sposób. Można wykorzystać opisane wcześniej produkty 12 i 17, zredukować grupę nitrową obecną w ich aglikonie do grupy aminowej i następnie przeprowadzić kondensację tak uzyskanych związków 75 i 76 z pochodnymi urydyny 56 i 65. W drugim wariancie można najpierw

otrzymać glikokoniugaty **78** i **79** w reakcji pochodnej **77**, uzyskanej przez redukcję grupy nitrowej w aglikonie akceptora **1**, z pochodnymi urydyny **56** lub **65**, a następnie uzyskane glikokoniugaty **78** i **79** poddać glikozylacji z donorami **2** lub **7** (Schemat 15). Przetestowałam oba warianty dojścia do finalnych glikokoniugatów i wykazałam, że obie drogi pozwoliły na otrzymanie oczekiwanych struktur, przy czym wydaje się, że w większości przypadków korzystniejsza jest glikozylacja glikokoniugatów **78** i **79** [46 (**H9**)].

Kolejnym krokiem w modyfikacji struktury fragmentu cukrowego było wyeliminowanie podstawnika w pozycji C-2 jednostki cukrowej i uzyskanie glikokoniugatów pochodnych 2-deoksycukrów. Aby uzyskać (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydy pochodne 2-deoksycukrów postanowiłam zastosować reakcję addycji 5-nitro-2-merkaptopirydyny **84** do zabezpieczonych grupami benzyłowymi lub acetyłowymi pochodnych D-glukalu **10** i **85** oraz D-galaktału **86** i **87** metodą Falcka-Mioskowskiego w obecności TPHB. Warunki reakcji pozwalają na uniknięcie przegrupowania Ferriera oraz zapewniają regioselektywną addycję do wiązania podwójnego. Jednak reakcje addycji do glikali zwykle nie zachodzą w sposób stereoselektywny i w ich wyniku powstaje mieszanina anomerycznych glikozydów. Jak już wcześniej opisywano, można poprawić stereoselektywność tej reakcji przez odpowiedni dobór grup ochronnych.

W omawianym przypadku korzystne jest otrzymanie obydwu produktów aby w kolejnych etapach uzyskać szerszą gamę glikokoniugatów o różnej konfiguracji na anomerycznym centrum przyłączonej jednostki cukrowej. Sprawdziłam jedynie, czy zastosowane grupy zabezpieczające w glikalach (acetylowe lub benzyłowe) w znaczący sposób wpływają na proporcje uzyskanych anomerycznych produktów i czy któreś z nich pozwalają na łatwiejszy rozdział anomerów. Okazało się, że na etapie syntezy (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów pochodnych 2-deoksy-D-glukozy i 2-deoksy-D-galaktozy **88–91** udało się wydzielić w postaci czystej jedynie anomery  $\alpha$  dla pochodnych D-galaktału, niezależnie od rodzaju wprowadzonych grup zabezpieczających. Dla pochodnych D-glukalu stosunek anomerów w produkcie ustalano na podstawie analizy widm NMR. Po zwiększeniu polarności związków poprzez redukcję grupy nitrowej obecnej w aglikonie 1-tioglikozydów do grupy aminowej, udało się rozdzielić prawie wszystkie glikozydy i do koniugacji z pochodnymi urydyny zastosowałam poszczególne anomery (Schemat 16). W ten sposób uzyskałam kolejną grupę glikokoniugatów urydynowych wzbogacających dotychczasową bibliotekę [91 (**H7**)].

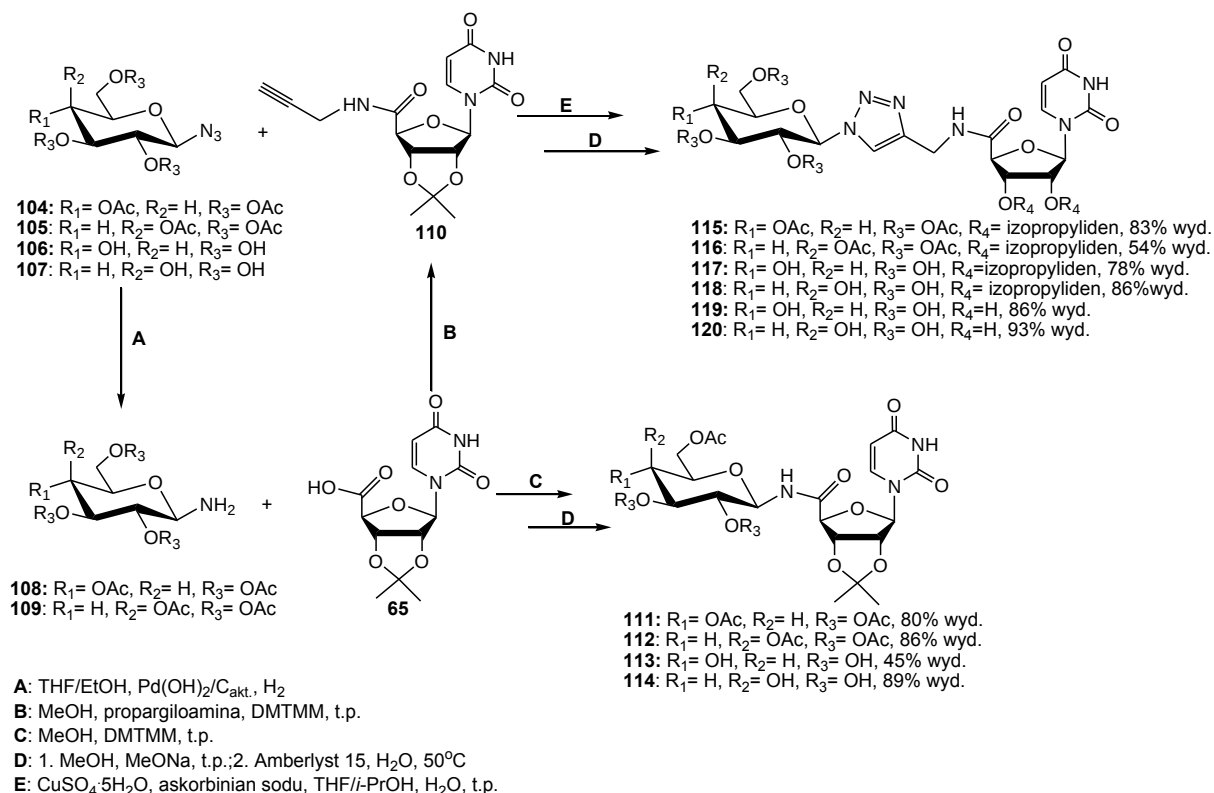


Schemat 16. Synteza glikokoniugatów zawierających fragment 2-deoksycukru

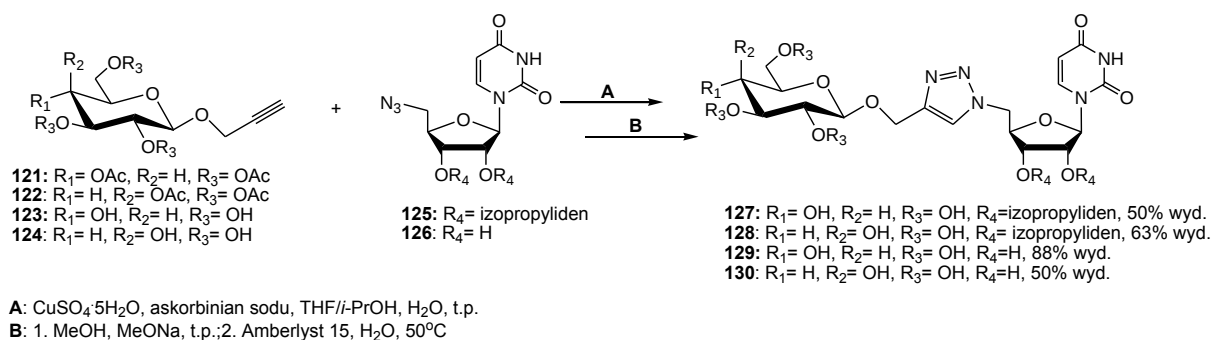
Kolejna grupa glikokoniugatów zaprojektowana została tak, aby sprawdzić, czy fragment heteroaromatyczny w strukturze linkera, inny niż dotychczas stosowany pierścień pirydynowy, jest korzystny z punktu widzenia aktywności biologicznej związku. W tym przypadku postanowiłam sprawdzić wpływ obecności pierścienia 1,2,3-triazolowego. Początkowo otrzymałam glikokoniugaty, w których fragment cukrowy był połączony z pochodną urydyny **65** bezpośrednio poprzez wiązanie amidowe (Schemat 17). Uzyskanie takich połączeń możliwe jest poprzez przeprowadzenie kondensacji pomiędzy pochodną urydyny **65** posiadającą grupę karboksylową w pozycji C-5' i 1-aminocukrami pochodnymi D-glukozy **108** i D-galaktozy **109**, uzyskanymi poprzez redukcję wodorek odpowiednich azydków cukrowych **104** i **105** z wykorzystaniem  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  osadzonego na węglu aktywowanym jako katalizatora [92, 93 (**H4**)]. Po przetestowaniu różnych warunków reakcji kondensacji, ponownie najlepszą wydajność glikokoniugatu **111** udało się uzyskać w przypadku stosowania DMTMM jako czynnika kondensującego i metanolu jako rozpuszczalnika [94 (**H3**)]. Właśnie te warunki zastosowałam również do syntezy glikokoniugatu **112**. Otrzymane glikokoniugaty poddałam następnie dwuetapowej deprotekcji, w której najpierw w środowisku zasadowym usuwałam zabezpieczenia acetylowe z fragmentu cukrowego, a następnie po dodaniu wody do

mieszaniny reakcyjnej i zakwaszeniu jej do pH=2 poprzez dodatek żywicy jonowymiennej Amberlyst 15, usuwałam zabezpieczenie izoprpylidenowe z fragmentu urydynowego uzyskując całkowicie odbezpieczone glikokoniugaty **113-114**. Warto podkreślić, że wiązanie amidowe w glikokoniugatach było wystarczająco stabilne w warunkach deprotekcji, co pozwoliło na uzyskanie odbezpieczonych pochodnych z dobrymi wydajnościami.

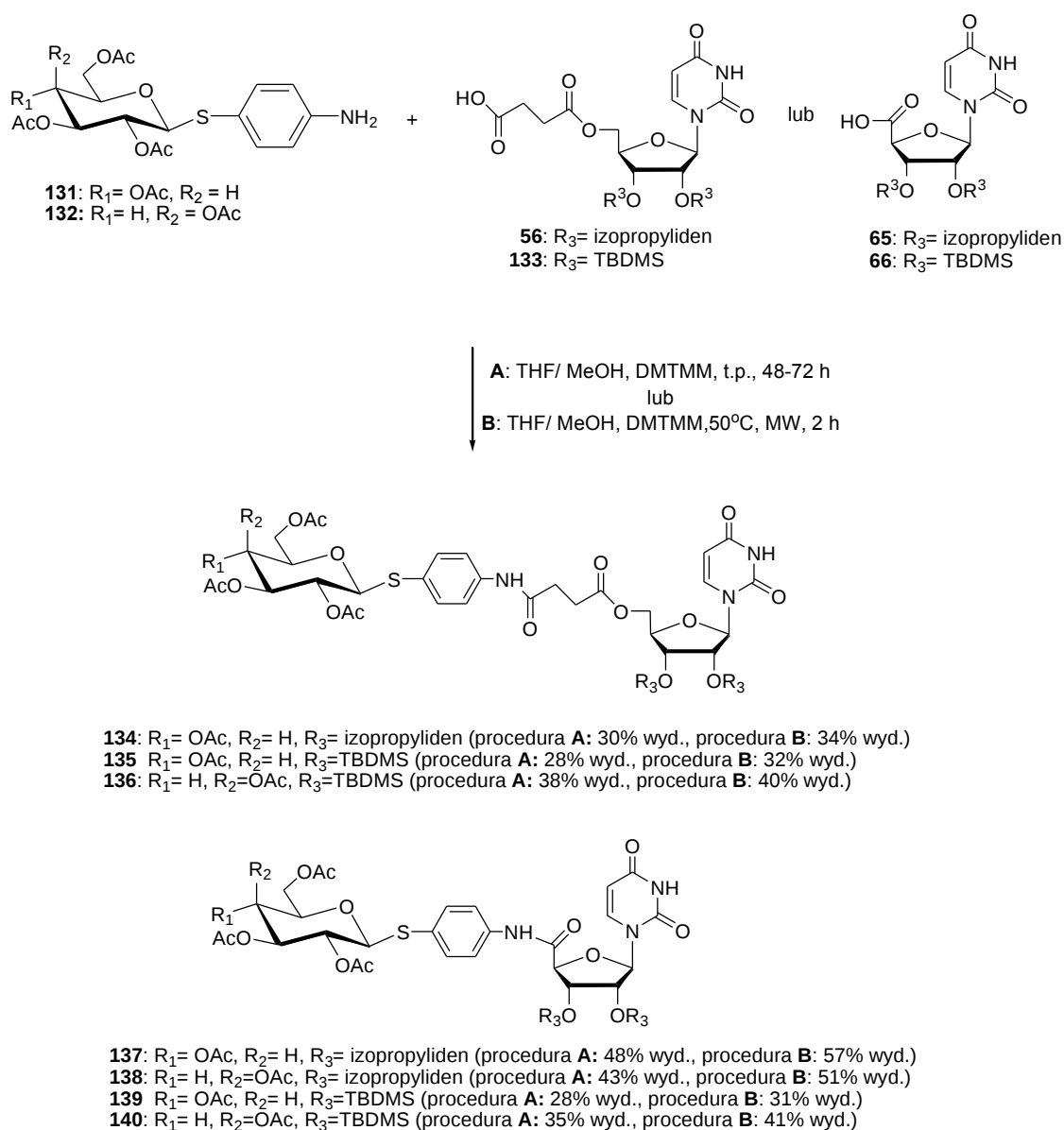
Do otrzymania glikokoniugatów zawierających heteroaromatyczny pierścień 1,2,3-triazolowy we fragmencie linkera łączącego cukier z urydyną postanowiłam wykorzystać popularną w ostatnich latach reakcję cykloaddycji 1,3-dipolarnej pomiędzy azydkami i alkinami katalizowanej jonami Cu(I) (CuAAC, copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) zaliczaną do szerokiej gamy reakcji tzw. *click chemistry*. Koncepcja tej reakcji została opisana po raz pierwszy w 2001 roku przez zespół K. Barry’ego Sharpless’a, laureata Nagrody Nobla [95]. Użycie jako katalizatora jonów Cu(I) poprawia wydajność tradycyjnej 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena o siedem rzędów wielkości. Dodatkowo, w porównaniu z klasyczną reakcją katalizowaną wysoką temperaturą, reakcja ta charakteryzuje się wysoką regioselektywnością, może być przeprowadzana zarówno w protycznych jak i aprotycznych rozpuszczalnikach, jest niezależna od sterycznych i elektronowych właściwości przyłączanych grup, wykazuje selektywność nawet w obecności innych niezabezpieczonych grup funkcyjnych i zwykle zachodzi w sposób ilościowy, co upraszcza oczyszczanie produktu. Najczęściej używanym katalizatorem w reakcji CuAAC nie są sole Cu(I) lecz pochodne Cu(II) np. CuSO<sub>4</sub> stosowane wraz z reduktorem, którym najczęściej jest askorbinian sodu odpowiadający za redukcję jonów Cu(II) do Cu(I). Zaletą stosowania soli Cu(II) jest ich niski koszt i często większa czystość w porównaniu do soli Cu(I) [96, 97]. Dzięki tak licznym zaletom, reakcje *click chemistry* stanowią nową i szybko rozwijającą się dziedzinę chemii o dużym potencjale, obejmującą syntezę nowych związków biologicznie aktywnych mogących znaleźć zastosowanie jako leki [19, 98].

Schemat 17. Synteza glikokoniugatów **111-120**

Syntezę glikokoniugatów z zastosowaniem azydków i pochodnych acetylenowych zrealizowałam w dwóch wariantach. W pierwszym z nich łączyłam zarówno zabezpieczone jak i odbezpieczone azydki glikozyłu **104–107** z propargilową pochodną urydyny **110**, uzyskaną w reakcji kondensacji pochodnej **65** z propargilaminą prowadzonej w obecności DMTMM. W efekcie uzyskałam całkowicie zabezpieczone glikokoniugaty **115** i **116**, glikokoniugaty odbezpieczone jedynie w części cukrowej **117** i **118** oraz glikokoniugaty **119** i **120** całkowicie pozbawione grup zabezpieczających (Schemat 17).

Schemat 18. Synteza glikokoniugatów **127-130**

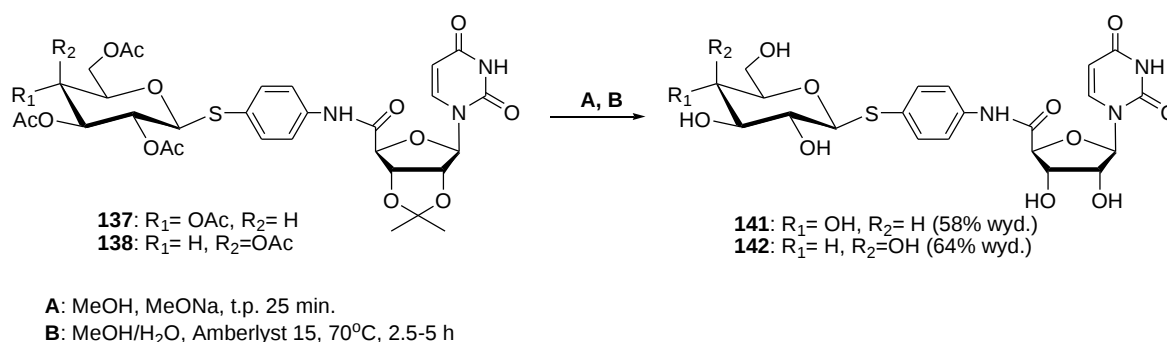
W drugim wariantcie łączyłam zabezpieczoną lub odbezpieczoną pochodną urydyny **125** lub **126** zawierającą ugrupowanie azydkowe przy węglu C-5' z zabezpieczonymi lub odbezpieczonymi propargilo β-D-O-glikozydami pochodnymi D-glukozy i D-galaktozy **121–124** (Schemat 18). Warto nadmienić, że uzyskane w ten sposób glikokoniugaty miały konfigurację β przy anomerycznym atomie węgla przyłączonej jednostki cukrowej. Jest to o tyle istotne, że naturalne substraty GTs mają przy tym węglu konfigurację α i takie właśnie analogi naturalnych substratów GTs opisał Fairbanks w swojej pracy. Związki otrzymane przez tę grupę były α-anomerami glikokoniugatów **129–130** i nie wykazywały zdolności do hamowania β1,4-GalT [72].



Schemat 19. Synteza glikokoniugatów **134-140**

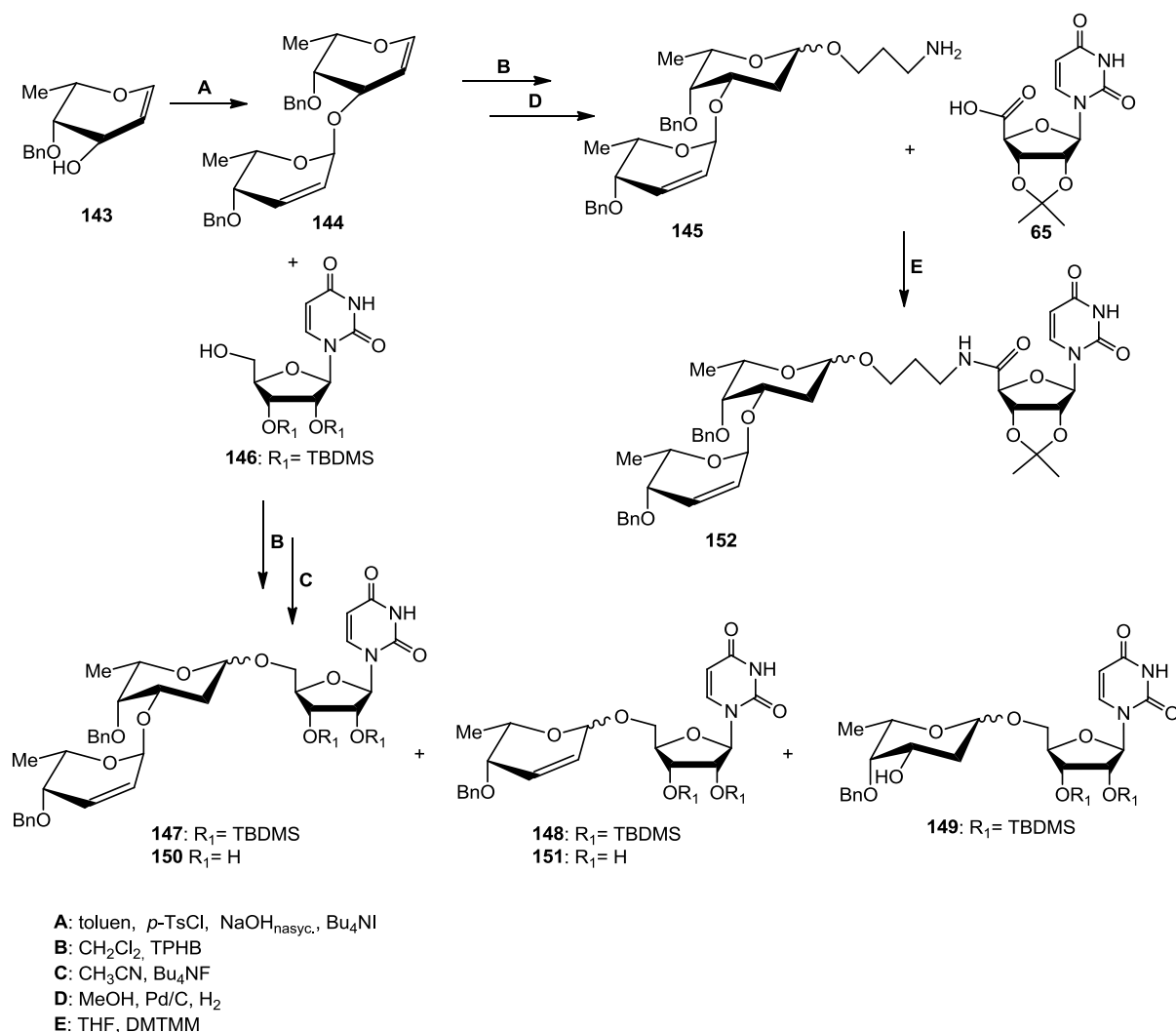
Kolejnym krokiem było zastąpienie heteroaromatycznego pierścienia pirydynowego w dotychczas opisanych glikokoniugatach pierścieniem benzenowym (Schemat 19) [99 (**H1**)]. Bodźcem do zaprojektowania tego typu struktur była chęć sprawdzenia, jak istotna dla aktywności biologicznej glikokoniugatów jest obecność lub brak w strukturze linkera heterocyklicznego atomu azotu. W tym celu wykorzystałam 4-aminofenylo 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- $\beta$ -D-1-tioglikopiranozydy pochodne D-glukozy i D-galaktozy **131-132** uzyskane w wyniku redukcji grupy nitrowej w aglikonie odpowiednich 4-nitrofenylo 1-tioglikozydów, których otrzymywanie opisano w literaturze [100]. Do redukcji grupy nitrowej zastosowałam tę samą procedurę z wykorzystaniem układu cynk/kwas octowy, którą zastosowałam wcześniej dla (5-nitro-2-pirydylo) 1-tioglikozydów. Kondensację związków **131-132** prowadziłam z pochodnymi urydyny **56**, **65**, **66** i **133** z wykorzystaniem DMTMM jako czynnika kondensującego. W celach porównawczych reakcje prowadziłam z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego (procedura **B**) lub w temperaturze pokojowej (procedura **A**). O ile wydajności uzyskanych glikokoniugatów **134-139** nie różniły się w sposób zdecydowany, niezależnie od zastosowanej procedury, to czas wymagany do ich uzyskania był zdecydowanie krótszy w przypadku prowadzenia reakcji w reaktorze mikrofalowym.

Uzyskane glikokoniugaty w kolejnym etapie poddałam deprotekcji stosując dwuetapową procedurę z wykorzystaniem metanolanu sodu w metanolu do usunięcia zabezpieczeń acetylowych oraz Amberlystu 15 do zakwaszenia środowiska reakcji w celu usunięcia zabezpieczenia izopropylidenowego we fragmencie urydynowym. Niestety, w przypadku usuwania grup zabezpieczających z pochodnej **134** destrukcji uległo wiązanie estrowe łączące linker bursztynowy z urydyną. Sukcesem zakończyła się za to deprotekcja glikokoniugatów **137** i **138**. Odpowiednie pochodne **141** i **142** uzyskałam z zadowalającymi wydajnościami (Schemat 20).



Schemat 20. Deprotekcja glikokoniugatów **137-138**

Ostatnia grupa glikokoniugatów urydynowych projektowanych jako potencjalne inhibitory GTs bazowała na pochodnej **144** otrzymanej w wyniku reakcji przegrupowania Ferriera zachodzącej dla 4-*O*-benzylo-L-fukalu **143** w warunkach przeniesienia międzyfazowego (Schemat 21). Disacharyd ten zawiera w swej strukturze fragmenty L-rodinozy oraz L-oliozy, będące pochodnymi 2-deoksyfukozy, które występują również jako składniki strukturalne wielu naturalnych biologicznie aktywnych związków przeciwnowotworowych [101, 102]. Dlatego zastosowanie pochodnych L-fukalu jako bloków budulcowych w syntezie różnych deoksyglikozydów wydaje się być interesujące. Dodatkowo, disacharyd **144** zawierający dwie 1,2- i 2-3 nienasycone heksozy może być łatwo funkcjonalizowany.



Schemat 21. Synteza glikokoniugatów **147-152**

Jedną z możliwych metod otrzymania glikokoniugatu z disacharydu **144** jest addycja nukleofila urydynowego **146** w obecności TPHB. Pomimo tego, że reakcję prowadzono w bezwodnym  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  w obniżonej temperaturze, to zaobserwowano powstawanie mieszaniny trzech glikokoniugatów, przy czym każdy z nich występował w postaci mieszaniny anomerów. Oprócz oczekiwanego produktu **147** powstały również glikokoniugaty **148** i **149** będące urydynowymi pochodnymi monosacharydów składowych związku **144**, które powstały po rozpadzie wiązania glikozydowego wskutek jego wysokiej reaktywności. Po usunięciu siliłowych grup zabezpieczających pozycje 2'-OH i 3'-OH we fragmencie rybozy działaniem fluorku tetra-*n*-butyloamoniowego powstały dodatkowo glikokoniugaty **150-151** (Schemat 21).

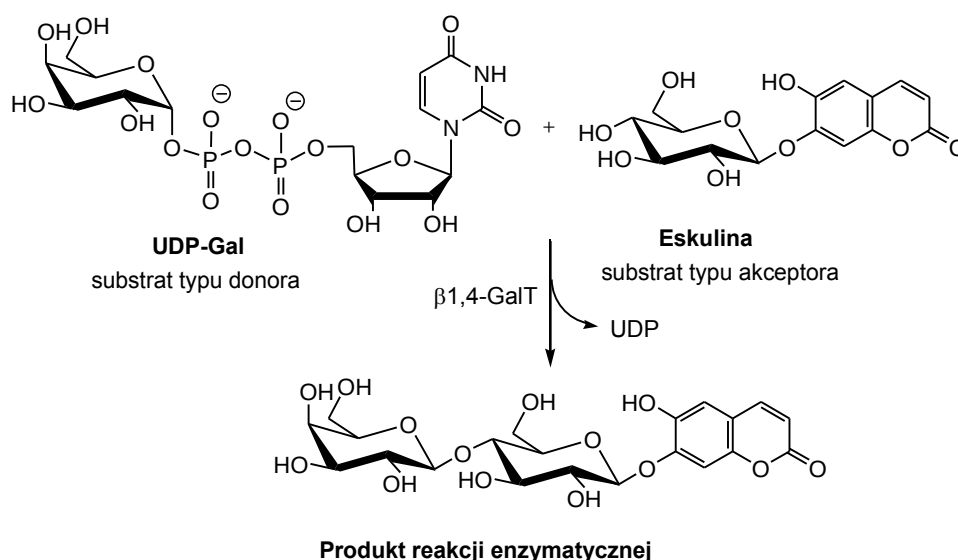
Drugi wariant prowadzący do uzyskania glikokoniugatu urydynowego **152**, zawierającego fragment pochodzący od disacharydu **144**, bazuje na przyłączeniu do cukrowego substratu trójwęglowego linkera zakończonego ugrupowaniem azydkowym, które może zostać zredukowane do grupy aminowej, i połączeniu powstałego w ten sposób związku **145** z pochodną urydyny **65** poprzez utworzenie wiązania amidowego. Ze względu na wcześniej wzmiankowana dużą reaktywność wiązania glikozydowego w disacharydzie, nie usuwano izopropylidenowej grupy zabezpieczającej fragment urydynowy. Obawiano się, że podczas deprotekcji może dojść do rozpadu wiązania glikozydowego [103 (**H5**)].

### **2.2.1. Ocena aktywności biologicznej uzyskanych glikokoniugatów**

Aktywność biologiczną uzyskanych glikokoniugatów urydynowych badałam pod kątem hamowania enzymu z grupy GTs z wykorzystaniem handlowo dostępnej  $\beta$ 1,4-GalT I z mleka krowiego, a także przeprowadzono badania *in vitro* pod kątem hamowania proliferacji komórek nowotworowych dla wybranych linii komórkowych: HCT 116 (rak jelita grubego) oraz DU 145 (rak prostaty). Oceniono również wybrane glikokoniugaty pod kątem aktywności przeciwwirusowej w stosunku do wirusów z rodziny *Flaviviridae*, do których należy wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. Hepatitis C Virus) oraz wirus klasycznej świńskiej gorączki (CSFV).

W reakcji enzymatycznej z udziałem  $\beta$ 1,4-GalT biorą udział dwa substraty: substrat typu donora, którym w przypadku tego enzymu jest UDP-Gal oraz substrat typu akceptora, którym w układach biologicznych najczęściej jest jednostka *N*-acetyloglukozaminy (GlcNAc) lub D-glukozy. Aby móc śledzić przebieg reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem HPLC wyposażonego w detektor fluorescencyjny należy do akceptora wprowadzić znacznik

fluorescencyjny. Grupa Praly opisała zastosowanie akceptora znakowanego w pozycji anomerycznej resztę dansylową do oznaczania aktywności  $\beta$ 1,4-GalT [104]. Jednak w tym przypadku konieczna jest dość żmudna synteza takiego akceptora. Podczas oceny aktywności biologicznej glikokoniugatów urydynowych opisanych w niniejszym przeglądzie zastosowałam analogiczną procedurę zastępując akceptor znakowany resztą dansylową komercyjnie dostępną eskuliną. Procedura polegała na pomiarze zmiany stężenia produktu (6-eskuletynylo) 4'-O- $\beta$ -D-galaktopiranozylo- $\beta$ -D-glukopiranozydu powstającego w reakcjach enzymatycznych z dodatkiem potencjalnych inhibitorów względem reakcji testowej eskuliny z UDP-galaktozą, katalizowanej przez  $\beta$ 1,4-GalT (Schemat 22) [94 (H3)].



Schemat 22. *Reakcja testowa do oceny aktywności  $\beta$ 1,4-GalT*

Przed przystąpieniem do badań sprawdziłam, czy badane związki nie są substratami w reakcji modelowej. Następnie przygotowałam roztwory reakcyjne, w których stężenie potencjalnego inhibitora wynosiło 0.8 mM i prowadziłam reakcje z dodatkiem enzymu. Po przerwaniu reakcji enzymatycznej przez ogrzewanie w temperaturze 90°C i odsączeniu zdenaturowanego białka, próbki analizowałam metodą HPLC w układzie faz odwróconych (kolumna Nucleosil® 5  $\mu$ m, C18, 100 Å, 250x4 mm) z detekcją fluorescencyjną (wzbudzenie 385 nm, emisja 540 nm). Stosowałam elucję układem rozpuszczalników MeCN:H<sub>2</sub>O 10:90.

Spośród przebadanych związków jedynie nieliczne pochodne wykazywały właściwości inhibujące względem  $\beta$ 1,4-GalT z mleka krowiego. Żaden z glikokoniugatów z zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi nie był zdolny do inhibicji  $\beta$ 1,4-GalT. Spośród

odbezpieczonych związków, które wykazywały zdolność do inhibicji  $\beta$ 1,4-GalT, wytypowałam te najaktywniejsze i dla nich przeprowadziłam serię reakcji enzymatycznych obejmujących stężenia 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 i 1.6 mM w celu wyznaczenia  $IC_{50}$ . Dla glikokoniugatu **129** będącego pochodną D-glukozy zawierającą fragment metylenotriazolowy w linkerze imitującym ugrupowanie difosforanowe naturalnego substratu wyznaczono wartość  $IC_{50} = 0.72$  mM. Interesujące jest to, że analogiczna pochodna D-galaktozy nie wykazała żadnej aktywności względem testowanego enzymu. Istotny jest również fakt, że badany przez Fairbanksa glikokoniugat, różniący się od związku **129** jedynie konfiguracją na anomerycznym atomie węgla jednostki cukrowej, nie wykazywał żadnej aktywności biologicznej. Można więc wyciągnąć wniosek, że konfiguracja na centrum anomerycznym jednostki cukrowej wpływa na zdolność glikokoniugatu do inhibicji testowanego enzymu. Spośród pochodnych zawierających w linkerze fragment amidopirydylowy, aktywność wykazała jedynie pochodna **74**, a wartość  $IC_{50} = 0.67$  mM świadczyła o zbliżonej aktywności tego związku w stosunku do pochodnej **129**. Z kolei wartość  $IC_{50} = 0.33$  mM wyznaczona dla glikokoniugatu **141**, będącego analogiem związku **74** pozbawionym heterocyklicznego atomu azotu w aglikonie, może sugerować że obecność tego heteroatomu w układzie aromatycznym, stanowiącym fragment linkera łączącego część cukrową z urydyną, nie jest kluczowa dla aktywności biologicznej względem testowanego enzymu. Powtarzającą się prawidłowością dla wszystkich glikokoniugatów, dla których udało się wyznaczyć wartość  $IC_{50}$  jest fakt, że wszystkie one są pochodnymi  $\beta$ -D-glukozy. Analogi tych związków będące pochodnymi  $\beta$ -D-galaktozy nie były w stanie hamować aktywności  $\beta$ 1,4-GalT.

Badania wpływu glikokoniugatów na stopień proliferacji komórkowej z wykorzystaniem prostego testu cytotoksyczności MTT zostały przeprowadzone początkowo pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Rusin oraz mgr inż. Katarzyny Papaj w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Badania aktywności glikokoniugatów zawierających w strukturze linkera pierścień triazolowy **115–130** lub jedynie bezpośrednie wiązanie amidowe pomiędzy cukrem a urydyną **111–114** zostały przeprowadzone przez mgr inż. Annę Byczek-Wyrostek w Laboratorium Genetyki Molekularnej i Inżynierii Genetycznej w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej.

Istotą metody MTT jest redukcja żółtego, rozpuszczalnego w wodzie bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) do fioletowego,

nierozpuszczalnego w wodzie formazanu [105]. Konwersja ta zachodzi przy udziale dehydrogenazy bursztynianowej, która wytwarzana jest tylko w żywych komórkach. W celu wykonania oznaczenia wysiane z odpowiednim pokryciem komórki inkubowano z badanymi związkami, a następnie z substratem (MTT). Na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru ilości wytworzonego produktu formazanu dokonano oceny stopnia zahamowania proliferacji komórek po potraktowaniu ich badanymi związkami. Niestety, żaden z badanych związków nie wykazał toksyczności względem badanych linii komórkowych.

Tabela 3

| Związek          | Aktywność przeciw wirusowi CSFV |                       |             | Aktywność przeciw wirusowi HCV |                       |       |
|------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|
|                  | CC <sub>50</sub> (μM)           | IC <sub>50</sub> (μM) | SI          | CC <sub>50</sub> (μM)          | IC <sub>50</sub> (μM) | SI    |
| <b>59</b>        | 207                             | 103                   | 2           | 325                            | 231                   | 1.4   |
| <b>61</b>        | 194                             | 49                    | 4           | 340                            | 213                   | 1.6   |
| <b>63</b>        | 45                              | 13                    | 3.5         | 71                             | 45                    | 1.6   |
| <b>68</b>        | >380                            | >325                  | >1.2        | 271                            | 244                   | 1.1   |
| <b>69</b>        | >353                            | >299                  | >1.2        | 312                            | 271                   | 1.2   |
| <b>70</b>        | 86                              | 3                     | 28.7        | 135                            | 7                     | 19.3  |
| <b>71</b>        | 151                             | 6                     | 25.2        | 173                            | 7                     | 24.7  |
| <b>72</b>        | 186                             | 97                    | 1.9         | >270                           | >236                  | >1.1  |
| <b>73</b>        | 350                             | 320                   | 1.1         | 402                            | 373                   | 1.1   |
| <b>74</b>        | 380                             | 370                   | 1           | 420                            | 402                   | 1.05  |
| <b>134</b>       | 103                             | 97                    | 1.1         | 399                            | 281                   | 1.4   |
| <b>135</b>       | 42                              | 4.5                   | 9.3         | 16                             | 4                     | 4.0   |
| <b>136</b>       | 124                             | 4.2                   | 29.5        | 254                            | 4.9                   | 52.4  |
| <b>137</b>       | 326                             | 149                   | 2.2         | 258                            | 154                   | 1.7   |
| <b>138</b>       | 340                             | 217                   | 1.6         | 272                            | 167                   | 1.6   |
| <b>139</b>       | 56                              | 4                     | 14.0        | 270                            | 13.5                  | 20.0  |
| <b>140</b>       | 49                              | 25                    | 2.0         | 14                             | 7.4                   | 1.9   |
| <b>141</b>       | 265                             | 241                   | 1.1         | >475                           | 444                   | >1.1  |
| <b>142</b>       | 278                             | 257                   | 1.1         | 460                            | 454                   | 1.0   |
| <b>SOFOBUVIR</b> | brak danych                     | brak danych           | brak danych | 31                             | 0.26                  | 119.2 |

CC<sub>50</sub> - stężenie wymagane do zmniejszenia przeżywalności komórek o 50%

IC<sub>50</sub> - stężenie wymagane do zmniejszenia populacji wirusa o 50%

SI - indeks selektywności liczony jako stosunek CC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>

Oprócz wspomnianych już arylo oraz (5-nitro-2-pirydylo) β-D-1-tioglikozydów oraz powstałych w wyniku ich utleniania sulfotlenków [27-29] na badania *in vitro* przekazano również wybrane glikokoniugaty pochodne (5-amino-2-pirydylo) β-D-1-tioglikozydów **59**, **61**, **63**, **68–74** oraz 4-aminofenylo β-D-1-tioglikozydów **134–142**. Badania wytypowanych

glikokoniugatów pod kątem aktywności przeciwwirusowej oraz cytotoksyczności prowadzone były przez dr Ewelinę Król z grupy profesora Bogusława Szewczyka z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego. Modelami na których badano aktywność tych pochodnych był wirus CSFV oraz wirus HCV [86 (**H2**)]. Badania wykazały, że spośród testowanych glikokoniugatów największą aktywność wykazały związki **70**, **71**, **136**, **139** i **140**, które hamowały nie tylko propagację wirusa w zakażonych komórkach w ilościach mikromolowych ale również w stopniu zależnym od dawki ograniczały produkcję białek wirusowych (Tabela 3). Związki te są również w stanie aż do 90% zredukować replikację genomu wirusowego. Dla glikokoniugatów **70** i **71** zawierających w swej strukturze pierścień pirydynowy stwierdzono akceptowalny indeks selektywności w zakresie 19-24,7.  $IC_{50}$  dla tych związków w przypadku obydwu badanych wirusów mieści się w przedziale 3–7  $\mu M$ , a dodatkowo nie stwierdzono ich toksyczności przy stężeniach z przedziału 150–245  $\mu M$  w zależności od typu zainfekowanych komórek. Glikokoniugaty **139** i **140**, będące odpowiednikami związków **70** i **71** zawierającymi w linkerze układ fenyłowy zamiast pirydynowego, charakteryzowały się nieco wyższymi wartościami  $IC_{50}$  mieszczącymi się w zakresie 4-25  $\mu M$ , przy jednoczesnym obniżeniu indeksu selektywności. Może to świadczyć o tym, że zastąpienie aromatycznego atomu azotu atomem węgla wpływa na nieznaczne obniżenie aktywności względem wirusa oraz wzrost toksyczności tych glikokoniugatów. Z kolei obecność linkera bursztynowego w glikokoniugacie **136** wpłynęła na zwiększenie jego aktywności przeciwwirusowej (wartości  $IC_{50}$  dla obu badanych wirusów mieszczą się w zakresie 4.2–4.9  $\mu M$ ) i zdecydowane zmniejszenie toksyczności (indeks selektywności SI wynosi odpowiednio 29.5 dla wirusa CSFV i 52.4 dla wirusa HCV). W tym przypadku można wysnuć wniosek, że pod nieobecność azotu w pierścieniu aromatycznym linkera, fragmentem wpływającym na wzrost aktywności przeciwwirusowej jest linker bursztynowy [99 (**H1**)].

Warto zwrócić uwagę, że kluczowa dla aktywności przeciwwirusowej okazała się obecność grup zabezpieczających zarówno fragment cukrowy, jak i część urydynową. Szczególnie korzystne okazało się wprowadzenie grup TBDMS zabezpieczających pozycje 2'-OH i 3'-OH we fragmencie urydynowym. Pozwala to na zwiększenie lipofilowości związku, co ułatwia przeniesienie przez błonę komórkową do komórki. Potwierdzeniem tej obserwacji wydaje się fakt, iż częściowo lub całkowicie odbezpieczone pochodne **73**, **74**, **141** i **142** praktycznie nie wykazywały aktywności przeciwwirusowej. Uzyskane wyniki wskazują,

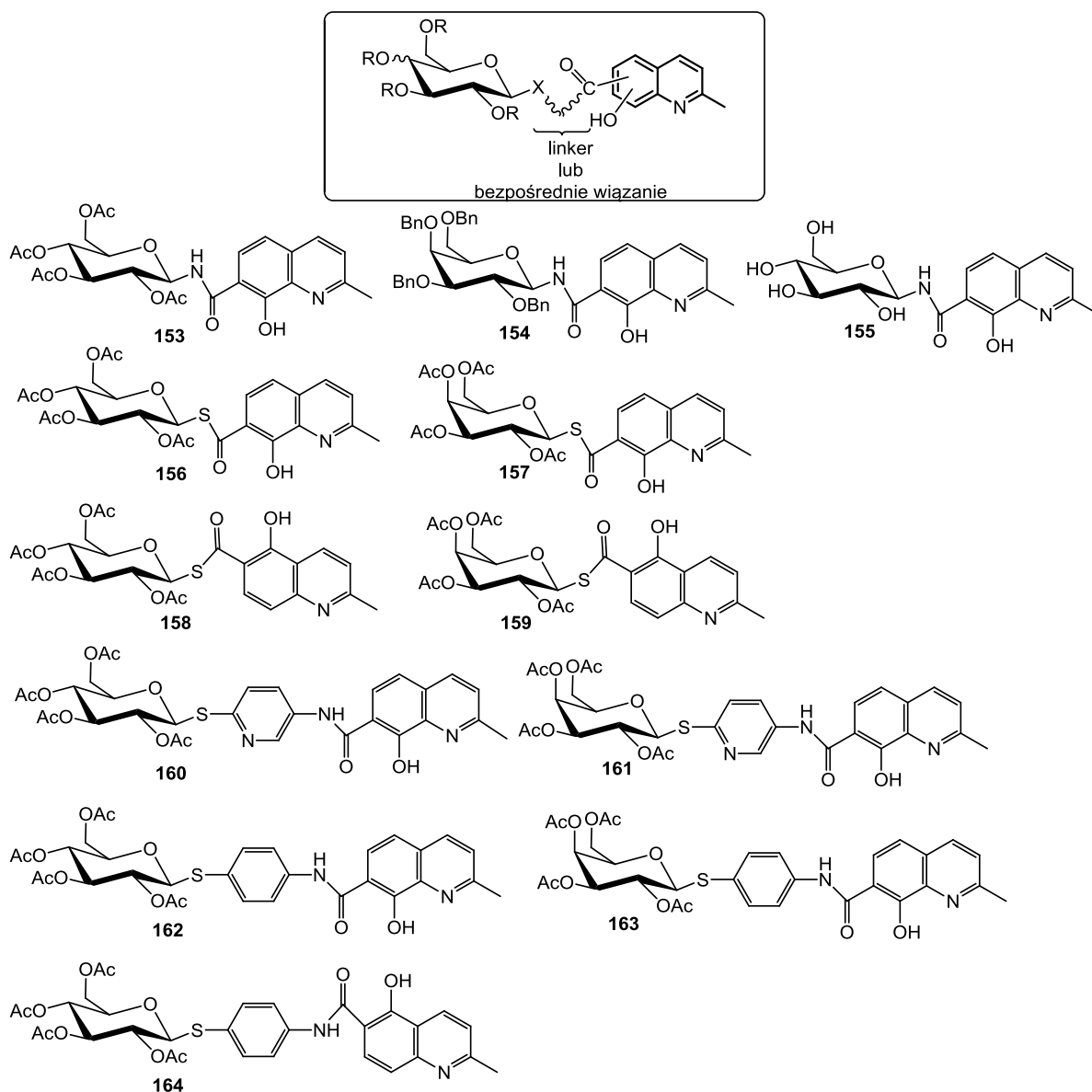
że struktury te mogą stanowić punkt wyjścia do opracowania nowych leków przeciw wybranym wirusom z rodziny *Flaviviridae*.

### **2.3. Synteza glikokoniugatów zawierających fragment chinolinowy jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych**

W związku z coraz częstszą zachorowalnością na różnego typu nowotwory, projektowanie nowych leków przeciwnowotworowych stało się istotnym elementem aktualnie prowadzonych badań. Niestety, w przypadku już stosowanych leków przeciwnowotworowych bardzo często występuje problem ich niskiej selektywności i związanych z tym skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej. Dlatego poznanie i wykorzystanie różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi i zdrowymi ma ogromne znaczenie podczas projektowania nowych leków.

Glukoza stanowi źródło energii dla podstawowych procesów metabolicznych zachodzących w komórce. Jest transportowana do wnętrza komórek przez specjalne transportery białkowe tzw. transportery GLUT. Różnica pomiędzy komórkami zdrowymi i komórkami nowotworowymi polega na tym, że w komórkach nowotworowych występuje specyficzny, mniej efektywny metabolizm glukozy opisany przez Otto Warburga, laureata Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, i nazwany na jego cześć efektem Warburga. Polega on na tym, że w komórkach nowotworowych zachodzi glikoliza połączona z fermentacją mlekową, charakterystyczna dla warunków hipoksji, a jej poziom jest znacznie wyższy (ponad stukrotnie) niż w komórkach zdrowych, dla których głównym źródłem energii jest mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna [106]. Komórki nowotworowe, ze względu na często występującą zwiększoną proliferację, mają też większe zapotrzebowanie na energię, a tym samym na glukozę będącą źródłem tej energii. Opierając się na tym zjawisku, podjęto próby zaprojektowania nowych leków mogących pełnić funkcję inhibitorów glikolizy i bazujących na strukturze glukozy. Dodatkowo, cukry sprzęgane ze związkami biologicznie aktywnymi poprawiają ich farmakokinetykę i biodostępność. W związku ze stwierdzoną nadekspresją transporterów GLUT w komórkach nowotworowych [107] słuszne wydaje się projektowanie glukokoniugatów, substratów GLUT, wykazujących aktywność przeciwnowotworową jako nowych selektywnych leków [108]. Ciekawym połączeniem okazały się być glikokoniugaty pochodne 8-hydoksychinoliny uzyskane poprzez połączenie cukru wiązaniem glikozydowym z grupą 8-OH w pochodnych chinoliny [37, 38]. Glikokoniugaty te przebadano na kilku liniach nowotworowych i stwierdzono, że wnikają one do komórki, tam ulegają hydrolizie enzymatycznej i uwalniają biologicznie aktywne aglikony.

Jednak aktywność glikokoniugatów była niższa niż samych aglikonów. Nie badano dokładnego mechanizmu oddziaływania tych związków, zakładano jednak, że może on być związany z zaburzeniami w metabolizmie jonów poprzez ich chelatowanie.



Schemat 23. Struktury otrzymanych glikokoniugatów chinolinowych

Bazując na tych doniesieniach, postanowiłam otrzymać glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny połączone w inny sposób niż poprzez wiązanie glikozydowe z grupą 8-OH chinoliny, jako że może ona być istotna w procesie chelatowania jonów. Dlatego postanowiłam otrzymać glikokoniugaty pochodne kwasów chinolinokarboksylowych, w których fragment cukrowy połączony jest z chinoliną poprzez wiązanie amidowe lub tioestrowe z wykorzystaniem obecnej w tych pochodnych grupy karboksylowej (Schemat 23).

Oprócz pochodnych D-glukozy postanowiłam otrzymać również pochodne D-galaktozy, jako że cukier ten wydaje się być istotny w przypadku raka jelita grubego [109, 110]. Jest to prawdopodobnie związane ze zwiększonym poziomem transporterów galaktozy w komórkach raka jelita [111].

Dysponując modelami cukrowymi wykorzystywanymi podczas wcześniej opisanych syntez glikokoniugatów (aminoarylo 1-tioglikozydy, 1-tiocukry oraz 1-aminocukry), przyłączyłam je do 2-metylo-7-karboksy-8-hydroksychinoliny oraz do 2-metylo-5-hydroksy-6-karboksychinoliny w wyniku reakcji kondensacji prowadzonych w testowanych wcześniej warunkach [93 (**H4**)]. Pewnym zaskoczeniem okazała się niska skuteczność DMTMM, stosowanego uprzednio z powodzeniem jako czynnik kondensujący podczas syntezy wiązania amidowego. Najprawdopodobniej spowodowane było to słabą rozpuszczalnością pochodnych chinoliny w stosowanym do reakcji THF. Ponieważ w przypadku pochodnych chinoliny konieczne okazało się stosowanie takich rozpuszczalników jak DMF lub pirydyna, w których DMTMM ulega demetylacji i staje się nieaktywny, postanowiłam zastosować klasyczny sposób aktywacji grupy karboksylowej z użyciem dialkylkarbodiimidu z dodatkiem HOBt.

Aktywność przeciwnowotworową uzyskanych glikokoniugatów **153-164** testowano względem komórek nowotworu jelita grubego HCT-116. Najaktywniejsze okazały się glikokoniugaty **160** i **161** powstałe w wyniku koniugacji (5-amino-2-pirydylo) per-O-acetylo-1-tio-β-D-glikozydów z 2-metylo-7-karboksy-8-hydroksychinoliną ( $IC_{50}$  w zakresie 4.42–7.86 μM). Istotny wpływ na aktywność miała obecność pierścienia pirydynowego w linkerze łączącym fragment cukrowy z chinoliną. Wystarczyło zamienić układ heteroaromatyczny na aromatyczny, jak ma to miejsce w przypadku glikokoniugatów **162** i **163**, aby wartość  $IC_{50}$  wzrosła do wartości mieszczących się w zakresie 8.94–12.59 μM, co świadczy o niższej aktywności tych związków. Okazało się, że aktywność glikokoniugatów w niektórych przypadkach (związki **160** i **161**) ponad stukrotnie przekracza aktywność ich wyjściowych składowych ( $IC_{50}$  powyżej 750 μM), a dodatkowo wzrastała w obecności wysokiego stężenia jonów miedzi. Ponadto, koniugaty te interkalowały do DNA komórki. Jako że nie poznano mechanizmu działania tych związków, a postulowano jedynie związek ich aktywności z generowaniem reaktywnych form tlenu (ROS) poprzez chelatowanie jonów metali, słuszne wydaje się kontynuowanie rozpoczętych badań.

Podsumowując można stwierdzić, że koniugowanie pochodnych chinoliny z fragmentem cukrowym, szczególnie za pośrednictwem linkera zawierającego pierścień heteroaromatyczny, zdecydowanie poprawia ich aktywność przeciwnowotworową.

## Podsumowanie

Badania omówione w prezentowanym autoreferacie mieszczą się tematycznie w programie studiów nad aktywnością biologiczną złożonych połączeń związków naturalnych realizowanych w Katedrze. Tematyka omawianego projektu prowadzona była w etapach obejmujących syntezę jednostek cukrowych, przejściowych substratów do koniugacji, opracowanie metodyki pozwalającej na uzyskanie glikokoniugatów oraz określenie zależności między strukturą pochodnych cukrowych a aktywnością biologiczną glikokoniugatów. W badaniach biologicznych określałam zależności między strukturą glikokoniugatów a właściwościami biologicznymi takimi jak: odpowiedź immunologiczna, inhibicja GTs, aktywność przeciwwirusowa lub przeciwnowotworowa.

Do oceny zdolności uzyskanych związków do inhibicji  $\beta$ 1,4-GalT wykorzystałam zmodyfikowany przeze mnie test wykorzystujący technikę HPLC z detektorem fluorescencyjnym. W teście tym zastosowałam handlowo dostępny związek: eskulinę jako substrat typu akceptora. Pozwoliło to na uniknięcie żmudnej syntezy akceptora dotychczas stosowanego w tego typu teście. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że przynajmniej część uzyskanych połączeń spełniła pokładane w nich oczekiwania. Co prawda, wyznaczone wartości  $IC_{50}$  są na poziomie 0.33-0.72 mM i nie rokuje zastosowania uzyskanych związków jako potencjalnych leków. Można jednak zauważyć pewne prawidłowości wpływające na poprawę aktywności uzyskanych struktur, co w przyszłości może pozwolić na otrzymanie aktywniejszych glikokoniugatów. Przede wszystkim istotna jest konfiguracja na centrum anomerycznym przyłączonej jednostki cukrowej (aktywniejsze są pochodne o konfiguracji  $\beta$ ), ważny jest rodzaj przyłączonego cukru (pochodne D-glukozy są aktywniejsze od pochodnych D-galaktozy), istotne jest usunięcie grup zabezpieczających w glikokoniugacie oraz dobór łącznika pomiędzy fragmentem urydynowym i cukrem, zdolnego do wiązania dwuwartościowych jonów metali.

Badania aktywności przeciwwirusowej uzyskanych glikokoniugatów wykazały z kolei, że rodzaj przyłączonej cząsteczki cukru ma znikomy wpływ na aktywność, a istotną funkcję pełnią grupy zabezpieczające zarówno cząsteczkę cukru, jak i fragment urydynowy. W tym przypadku, acetylowe zabezpieczenie we fragmencie cukrowym i silylowe zabezpieczenia we fragmencie urydynowym poprawiały w znaczący sposób lipofilowość związków i pozwalały na zaobserwowanie ich zdolności do hamowania namnażania wirusów z rodziny *Flaviviridae*.

Również koncepcja glikokoniugacji kwasów chinolinokarboksylowych, szczególnie za pośrednictwem linkera zawierającego pierścień heteroaromatyczny, zdecydowanie poprawia ich aktywność przeciwnowotworową.

### **Dalsze plany badawcze**

Pozytywne wyniki badań mających na celu określenie aktywności biologicznej uzyskanych glikokoniugatów skłaniają mnie do kontynuowania syntezy biblioteki tego typu połączeń z nadzieją, że po wprowadzeniu pewnych zmian prowadzących do udoskonalenia finalnych struktur, uda się ulepszyć ich aktywność biologiczną. Znając już pewne zależności struktura-aktywność można wskazać elementy kluczowe, które powinny się w glikokoniugacie znaleźć. Połączenie za pomocą wiązania amidowego fragmentu cukrowego z farmakoforem wydaje się korzystne ze względu na stabilność wykazywaną zarówno podczas manipulacji związanych z syntezą, jak i w układach biologicznych. Dodatkowo, obecność układu heteroaromatycznego w linkerze pomiędzy fragmentem cukrowym a farmakoforem polepsza właściwości biologiczne finalnych glikokoniugatów. Zanim jednak przystąpię do dalszych prac syntetycznych, konieczne będzie opublikowanie kompletu wyników do tej pory uzyskanych, co pozwoli stworzyć pełny obraz wpływu struktury związku na jego aktywność biologiczną.

Wysoka aktywność przeciwwirusowa niektórych glikokoniugatów urydynowych zachęca również do kontynuowania współpracy z grupą profesora Bogusława Szewczyka z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i przebadania wpływu modyfikacji strukturalnych wprowadzonych w otrzymanych glikokoniugatach na wykazywaną przez nie aktywność względem wirusów z rodziny *Flaviviridae*. Obserwowana dla glikokoniugatów urydynowych, zawierających w strukturze linkera układ triazolowy, zdolność do hamowania modelowego enzymu z grupy GTs zachęca do dalszych prac nad rozszerzeniem grupy dostępnych modeli i oceny ich zdolności do hamowania wirusów z rodziny *Flaviviridae*.

Zdaję sobie sprawę, że poza pracą koncepcyjną, konieczne jest także podjęcie pewnych działań organizacyjnych, które zamierzam wykonać, a które pozwoliłyby w dalszej perspektywie na stworzenie interdyscyplinarnej grupy badawczej i pozyskanie środków na badania.

Obiecujące wyniki aktywności przeciwnowotworowej uzyskane dla glikokoniugatów chinolinowych skłaniają do kontynuowania także tego wątku. Udana współpraca z grupą dr hab. Roberta Musioła, uwieńczona wspólnym patentem i publikacją, będzie dalej rozwijana. Przygotowaliśmy wspólny projekt, w którym planujemy otrzymać i przebadать szereg glikokoniugatów chinolinowych, w których kluczową rolę odgrywać będzie łącznik heteroaromatyczny. Aby udowodnić kluczowy wpływ grupy hydroksylowej w pozycji C-8 chinoliny, pragniemy otrzymać zarówno pochodne 8-hydroksychinoliny łączone w tej właśnie pozycji, jak i ich analogi z grupą OH w innej pozycji lub też pozbawione tej grupy. Otrzymane glikokoniugaty zostaną poddane badaniom *in vitro* mającym na celu określenie ich aktywności przeciwnowotworowej oraz określenie możliwych mechanizmów działania. Badania biologiczne będą realizowane we współpracy z dr Anną Mrozek-Wilczkiewicz z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego, a część z nich będzie konsultowana z dr hab. Gabriellą Kramer-Marek, kierownikiem Preclinical Molecular Imaging Team w Institute of Cancer Research w Londynie. Wystąpiliśmy z wnioskiem o finansowanie opisanego projektu przez NCN, a w jego realizację zaangażowana będzie doktorantka, której jestem kopromotorem.

Kolejny wątek zaplanowanych w najbliższym czasie badań będzie bazował na współpracy z dr inż. Mirosławą Grymel z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii i będzie związany z zastosowaniem strategii łączenia jednostek cukrowych z układem triterpenowym metodą typu *click chemistry*, która jak wykazano we wcześniejszych badaniach nad syntezą glikokoniugatów chinolinowych, zapewnia prosty i efektywny sposób łączenia dwóch cząsteczek. Tego rodzaju połączenie jednostki cukrowej z betulina za pomocą układu triazolowego, oparte na reakcjach cykloaddycji 1,3-dipolarnej, stwarza nowy kierunek modyfikacji triterpenów typu lupanu. Szeroko opisywane w literaturze różnorodne modyfikacje chemiczne wiodącej struktury betuliny ukierunkowane są na zmianę jej właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych. Najbardziej obiecujące są właściwości przeciwnowotworowe, oparte o mechanizm indukcji apoptozy. Drugie miejsce zajmują prace dotyczące jej działania przeciw ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV), należącego do rodziny retrowirusów. Kolejne szerokie zastosowanie triterpenów to supresja grupy wirusów, m.in. wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus*, HPV), opryszczki pospolitej typu 1 (ang. *Herpes Simplex Virus*, HSV-1) oraz typu 2 (HSV-2), a także ospy wietrznej-półpaśca (VZV).

Głównym celem chemicznych modyfikacji szkieletu betuliny jest zwiększenie jej biodostępności. Planowane we współpracy z dr inż. M. Grymel badania dotyczące połączeń triterpenów z jednostkami cukrowymi mają na celu poprawę rozpuszczalności analogów betuliny w środowisku wodnym (surowica krwi, polarne rozpuszczalniki wykorzystywane w testach biologicznych) i wyeliminowanie tym samym głównej przeszkody, jaka stoi na drodze do rozwoju klinicznego tych związków. Doniesienia literaturowe sugerują, iż reszty cukrowe wpływają pozytywnie na właściwości farmakokinetyczne swoich pochodnych (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja). Ponadto, komórki rakowe potrzebują większej podaży cukrów niż komórki normalne, co może być wykorzystane jako droga wprowadzenia środka terapeutycznego bezpośrednio w miejsce guza. Tak więc, otrzymane w toku planowanych badań analogi betuliny zostaną poddane testom *in vitro* w celu zbadania ich właściwości cytotoksycznych. Na tym polu zawiązała się współpraca z dr Anną Lalik z Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej, która jest specjalistą w zakresie biochemii i biologii molekularnej. Zakładamy, że pozytywne wyniki wstępnych badań aktywności biologicznej uzyskanych połączeń pozwolą na zgłoszenie któregoś ze studentów zaangażowanych we współpracę przy realizacji tych badań do konkursu w programie Diamentowy Grant.

W tym samym nurcie tematycznym, związanym z glikokoniugacją znanych związków aktywnych biologicznie, mieści się kolejny wątek badań, w które w ostatnim czasie się zaangażowałam. Badania te bazują na przyłączeniu fragmentu cukrowego do powszechnie stosowanych w chemioterapii leków przeciwnowotworowych np. metotreksatu. Takie modyfikacje mają na celu zwiększenie biodostępności oraz selektywności tego typu leków. Partnerem w tych badaniach, na etapie oceny aktywności biologicznej uzyskanych połączeń, jest grupa z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, którą kieruje dr Siddarth Agrawal.

Oprócz realizowania opisanej działalności naukowej i dydaktycznej, ściśle związanej z pracą na uczelni (promotorstwo prac dyplomowych i projektów inżynierskich, przygotowanie materiałów do nowych przedmiotów w ramach specjalności Chemia farmaceutyczna i kosmetyczna, opieka nad studentami z koła naukowego, zaangażowanie w realizację Indywidualnych Programów Studiów w formie Project Based Learning w ramach dużego projektu „Politechnika Śląska jako Centrum Nowoczesnego Kształcenia opartego o badania i innowacje”), konieczne wydaje się, w związku z tym że jest to uczelnia techniczna, nawiązanie współpracy z firmami produkcyjnymi i podjęcie próby komercjalizacji wyników

naukowych. Nawiązałam taką współpracę ze spółką Millvent, która poszukiwała eksperta z obszaru chemii cukrów. Współpraca dotyczy tematyki związanej z modyfikacją detergentów z wykorzystaniem złożonych pochodnych cukrowych. Ze względu na podpisane porozumienie o zachowaniu poufności, nie mogę w chwili obecnej podać szczegółów planowanego projektu.

Kolejnym sposobem na wykorzystanie posiadanej wiedzy do współtworzenia rozwiązań potrzebnych w przemyśle jest nawiązanie współpracy z firmą Sestec Polska Sp. z o. o. Firma ta zajmuje się tworzeniem żywic klejowych, które mogą zastąpić dominujące na rynku toksyczne kleje mocznikowo-formaldehydowe stosowane do materiałów zawierających celulozę, czyli produktów przetwórstwa drzewnego. Ich produkty są pozbawione formaldehydu, a także zawierają w swoim składzie naturalne składniki. Nasza współpraca miałaby polegać na opiece merytorycznej, a przyszłościowo na byciu promotorem pracy doktorskiej pani Anny Sieranc zatrudnionej w firmie Sestec. Wspomniana praca doktorska ma dotyczyć problematyki udoskonalania parametrów kleju otrzymywanego na bazie surowców naturalnych i byłaby realizowana w ramach tzw. „doktoratu wdrożeniowego”.

#### **Literatura cytowana, w tym prace będące podstawą osiągnięcia naukowego (H1-H13)**

1. Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.; Hart, G.; Etzler, M. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY **2009**.
2. Sears, P.; Wong, C.-H. Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 223–252.
3. Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683–720.
4. Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, 126, 855–867.
5. Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G.-J. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chem. Commun.* **2009**, 36, 5335–5349.
6. Dube, D. H.; Bertozzi, C.R. Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 477–488.
7. Jung, K. H.; Schmidt, R. R., Glycosyltransferase Inhibitors: *Carbohydrate-based Drug Discovery*. Ch.-H. Wong Ed., Wiley-VCH, Weinheim **2003**, tom 2, 609–659.
8. Kajimoto, T.; Node, M. Synthesis of inhibitors against glycosyltransferases. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2006**, 64, 894–912.
9. Kajimoto, T.; Node, M. Synthesis of Glycosyltransferase Inhibitors. *Synthesis* **2009**, 19, 3179–3210.
10. Gloster, T. M. Development of inhibitors as research tools for carbohydrate processing enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, 40, 913–928.
11. Wang, S.; Vidal, S. Recent design of glycosyltransferase inhibitors. *Carbohydr. Chem.* **2013**, 39, 78–101.
12. Thorson, J. S.; Vogt, T. Glycosylated Natural Products: *Carbohydrate-based Drug Discovery*. Ch.-H. Wong Ed., Wiley-VCH, Weinheim **2003**, tom 2, 685–712.

13. Patel, S. Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2016**, *84*, 1036–1041.
14. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Lima, L. M. Natural Products as Lead Compounds in Medicinal Chemistry, *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*. V. Cechinel-Filho Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA **2012**, *3*, 81–126.
15. Arcamone, F.-M. Anthracyclines: *Anticancer Agents from Natural Products*. G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman, Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton **2012**, *16*, 383–405.
16. Francis, T. Jr.; Tillett, W. S. Cutaneous reactions in pneumonia. The development of antibodies following the intradermal injection of type-specific polysaccharide. *J. Exp. Med.* **1930**, *52*, 573–85.
17. Morelli, L.; Poletti, L.; Lay, L. Carbohydrates and Immunology: Synthetic Oligosaccharide Antigens for Vaccine Formulation. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *29*, 5723–5777.
18. Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Synthetic Carbohydrate-based Vaccines: *Carbohydrate-based Drug Discovery*. Ch.-H. Wong Ed., Wiley-VCH, Weinheim **2003**, tom 1, 381–406.
19. Campo, V. L.; Carvalho, I. Click chemistry applied to carbohydrate-based drug discovery: *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies*. Z.J. Witczak, I R. Bielski Ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2013, 325–357.
20. Cipolla, L.; Araújo, A. C.; Bini, D.; Gabrielli, L.; Russo, L.; Nasrin, S. Discovery and design of carbohydrate-based therapeutics. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 721–737.
21. Pastuch, G.; Szeja, W. A facile and efficient synthesis of S-glycosylated derivatives of 5-nitropyridine. *Carbohydr. Lett.* **1997**, *2*, 281–286.
22. Pastuch, G.; Szeja, W. Simple synthesis of 2-thioglycosyl derivatives of pyridine N-oxide. *Pol. J. Chem.* **2000**, *74*, 227–230.
23. Roy, R.; Andersson, F. O.; Letellier, M. “Active” and “latent” thioglycosyl donors in oligosaccharide synthesis. Application to the synthesis of  $\alpha$ -sialosides. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6053–6056.
24. Cao, S.; Gon, Z; Roy, R. Active – latent glycosylation strategy toward Lewis X pentasaccharide in a form suitable for neoglycoconjugate syntheses. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, 75–81.
25. Pastuch, G. Synteza i zastosowanie pochodnych 1-tiocukrów w reakcjach glikozylacji, praca doktorska, Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej, Gliwice **1999**.
26. Martinez, R.; Chacon-Garcia, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 127–151.
27. Gryniewicz G.; Król E.; Pastuch-Gawolek G.; Szeja W.; Szewczyk B. Zastosowanie sulfidów i sulfotlenków glikozylowo heteroarylowych jako związków przeciwwirusowych, zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny *Flaviridae*, zgłoszenie patentowe P.381650 z 31.01.2007, nr patentu PL212067-B1, data publikacji 31.08.2012.
28. Pastuch, G.; Szeja, W.; Gryniewicz, G.; Szewczyk, B. Król, E. 1-Thiosugars: synthesis and biological activity against CSFV glycoproteins, The Fifth Multidisciplinary Conference on Drug Research, Darłówko Wschodnie, 15–17.05.2006.
29. [H6] Król, E.; Pastuch-Gawolek, G.; Nidzworski, D.; Rychłowski, M; Szeja, W.; Gryniewicz, G.; Szewczyk, B. Synthesis and antiviral activity of a novel glycosyl sulfoxide against classical swine fever virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2662–2670.
30. Chapel, C.; Garcia, C.; Bartosch, B.; Roingeard, P.; Zitzmann, N.; Cosset, F. L.; Dubuisson, J.; Dwek, R. A.; Trepo, C.; Zoulim, F.; Durantel, D. Reduction of the infectivity of Hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1133–1143.

31. Wang, R.; Steensma, D. H.; Takaoka, Y.; Yun, J. W.; Kajimoto, T.; Wong, Ch-H. A search for pyrophosphate mimics for the development of substrates and inhibitors of glycosyltransferases., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 661–672.
32. Ballell, L.; Young, R. J.; Field, R. A. Synthesis and evaluation of mimetics of UDP and UDP- $\alpha$ -D-galactose, dTDP and dTDP- $\alpha$ -D-glucose with monosaccharides replacing the key pyrophosphate unit. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1109–1115.
33. Brown, J. R.; Yang, F.; Sinha, A.; Ramakrishnan, B.; Tor, Y.; Qasba, P. K.; Esko, J. D. Deoxygenated Disaccharide Analogs as Specific Inhibitors of  $\beta$ 1–4-Galactosyltransferase 1 and Selectin-mediated Tumor Metastasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 4952–4959.
34. Chung, S. J.; Takayama, S.; Wong, C.-H. Acceptor substrate-based selective inhibition of galactosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3359–3364.
35. Biet, T.; Peters, T. Molecular recognition of UDP-Gal by  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase T1. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4189–4192.
36. Song, Y.; Xu, H.; Chen, W.; Zhan, P.; Liu, X. 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad ranging pharmacological potential. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 5, 61–74.
37. Oliveri, V.; Giuffrida, M. L.; Vecchio, G.; Aiello, C.; Viale, M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Trans.* **2012**, 41, 4530–4535.
38. Oliveri, V.; Viale, M.; Aiello, C.; Vecchio, G. New 8-hydroxyquinoline galactosides. the role of the sugar in the antiproliferative activity of copper(II) ionophores. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 142, 101–108.
39. Boons, G.-J.; Hale, K. J. Oligosaccharide synthesis, *Organic synthesis with carbohydrate*. Sheffield Academic Press, Malden, USA, **2000**, 4, 103–154.
40. Aguilera, B.; Jiménez-Barbero, J.; Fernández-Mayoralas, A. Conformational differences between Fuc( $\alpha$ 1–3)GlcNAc and its thioglycoside analogue. *Carb. Res.* **1998**, 308, 19–27.
41. Buckingham, J.; Brazier, J. A.; Fisher, J.; Cosstick, R. Incorporation of a S-glycosidic linkage into a glyconucleoside changes the conformational preference of both furanose sugars. *Carb. Res.* **2007**, 342, 16–22.
42. Yuasa, H.; Hashimoto, H. Recent Advances in the Development of Unnatural Oligosaccharides. *Trends in Glycosci. Glyc.* **2001**, 13, 31–55.
43. Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. Synthetic Routes to Thiooligosaccharides and Thioglycopeptides. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 160–187.
44. Stallings-Mann, M.; Jamieson, L.; Regala, R. P.; Weems, C.; Murray, N. R.; Fields, A. P. A Novel Small-Molecule Inhibitor of Protein Kinase C $\alpha$  Blocks Transformed Growth of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* **2006**, 66, 1767–1774.
45. [H13] Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. (5-Nitro-2-pyridyl) 1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside as stable and reactive acceptor. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 9923–9926.
46. [H9] Pastuch, G.; Komor, R.; Grec, M.; Szeja, W. 5-Nitro-2-pyridyl 1-thioglucosides: application in synthesis of analogues of glycosyltransferases natural substrates. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **2010**, 67, 642–651.
47. [H11] Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. Regio- and stereoselectivity in glycosylation of partially protected 1-thioglycosides with glycals. *Pol. J. Chem.* **2007**, 81, 161–170.
48. Wandzik, I.; Pastuch, G.; Szeja, W. Stereoselective synthesis of (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -linked di- and trisaccharides, derivatives of 2-deoxysugars. *Pol. J. Chem.* **2005**, 79, 1681–1687.
49. [H12] Pastuch, G.; Wandzik, I.; Szeja, W. Stereoselective one-pot synthesis of isomaltooligosaccharides. *Pol. J. Chem.* **2003**, 77, 995–999.

50. Lopez, J. C.; Gomez, A. M.; Uriel, C.; Fraser-Reid, B. Thioglycoside and trichloroacetimidate donors in regioselective glycosylations. Comparison with *n*-pentenyl glycosides. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1417–1420.
51. Moitessier, N.; Chapleur, Y.; Modulation of the relative reactivities of carbohydrate secondary hydroxyl groups. Modification of the hydrogen bond network. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *44*, 1731–1735.
52. Smoot, J. T.; Demchenko, A. V. Oligosaccharide synthesis: from conventional methods to modern expeditious strategies. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **2009**, *62*, 161–250.
53. Bolitt, V.; Mioskowski, Ch.; Lee, S. G.; Falck, J. R. Direct preparation of 2-deoxy-D-glucopyranosides from glycals without Ferrier rearrangement. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5812–5813.
54. Caille, V.; Bossi, P.; Grimaldi, D.; Vieillard-Baro, A. Physiopathology of severe sepsis. *Press. Med.* **2004**, *33*, 256–261.
55. R Finkelstein, R.; Oren, I. Sepsis: Antimicrobial Therapy: Sepsis, *An Ongoing and Significant Challenge*. L. Azevedo Ed., InTech, **2012**, *16*, 311–330.
56. Antonacci Carvalho, P. R.; Trotta, E. A. Advances in sepsis diagnosis and treatment. *Jornal de pediatria* **2003**, *79*, Supl. 2, S195–S204.
57. Hecht, M. L.; Stallforth, P.; Silva, D. V.; Adibekian, A.; Seeberger, P. H. Recent advances in carbohydrate-based vaccines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 354–359.
58. Rossol, M.; Heine, H.; Meusch, U.; Quandt, D.; Klein, C.; Sweet, M. J.; Hauschildt, S LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* **2011**, *31*, 379–446.
59. Morrison, D. C.; Silverstein, R.; Luchi, M.; Shnyra, A. Structure-function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **1999**, *13*, 313–340.
60. Berti, F.; Adamo R. Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives. *ACS Chem Biol.* **2013**, *8*, 1653–1663.
61. Lipiński, T.; Ejchart, A.; Bernatowicz, P.; Pastuch-Gawolek, G.; Gawlik-Jędrzyak, M.; Dzierzba, K.; Szeja, W.; Gamian, A. Synthesis of model aminoacyl methylglycosides and NMR spectroscopic analysis of site of esterification on sugar ring. *Sepsis* **2001**, *4*, 85–90.
62. [H8] Dzierzba, K.; Grec, M.; Pastuch-Gawolek, G.; Lipiński, T.; Pietkiewicz, J.; Gamian, A. Synthesis of glycinated glycoconjugates based on 1-thioglycosides and their preliminary studies as potential immunomodulatory factor. *Acta Pol. Phar. Drug. Res.* **2012**, *69*, 1224–1238.
63. Dzierzba, K. Badanie właściwości biologicznych glicylowanych struktur węglowodanowych, praca doktorska, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, **2014**.
64. Weijers, C. A. G. M.; Franssen, M. C. R.; Visser, G. M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 436–456.
65. Bowles, D.; Isayenkova, J.; Lim, E.-K.; Poppenberger, B. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Op. Plant Biol.* **2005**, *8*, 254–263.
66. Breton, Ch.; Fournel-Gigleux, S.; Palcic, M. M. Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 540–549.
67. Lairson, L.; Henrissat, B.; Davies, G.; Withers, S. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
68. Compain, P.; Martin, O. R.; Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077–3092.
69. Pesnot, T.; Jørgensen, R.; Palcic, M. M.; Wagner, G. K. Structural and mechanistic basis for a new mode of glycosyltransferase inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 321–323.

70. Descroix, K.; Pesnot, T.; Yoshimura, Y.; Gehrke, S. S.; Wakarchuk, W.; Palcic, M. M.; Wagner, G. K. Inhibition of galactosyltransferases by a novel class of donor analogues. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2015–2024.
71. Wang, S.; Shen, D. L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebvre, T.; Mario Pinto, B.; Vocadlo, D.; Vidal, S. Design of glycosyltransferase inhibitors targeting human O-GlcNAc transferase (OGT), *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1172–1178.
72. Yeoh, K. K.; Butters, T. D.; Wilkinson, B. L.; Fairbanks, A. J. Probing replacement of pyrophosphate via click chemistry; synthesis of UDP-sugar analogues as potential glycosyl transferase inhibitors. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 586–591.
73. Wang, S.; Cuesta-Seijo, J. A.; Lafont, D.; Palcic, M. M.; Vidal, S. Design of glycosyltransferase inhibitors: pyridine as a pyrophosphate surrogate. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15346–15357.
74. Wandzik, I.; Bieg, T. Adducts of uridine and glycals as potential substrates for glycosyltransferases. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 401–416.
75. Singh, V. P.; Gupta, P. Synthesis and spectral studies of metal(II) complexes with succinic acid dihydrazones and their biological activity. *Pharm Chem. J.* **2008**, *42*, 196–201.
76. Dhanaraj, C. J.; Nair, M. S. Synthesis and characterization of metal(II) complexes of poly(3-nitrobenzylidene-1-naphthylamine-co-succinic anhydride). *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 565–572.
77. [H10] Pastuch-Gawolek, G.; Bieg, T.; Szeja, W.; Flasz, J. 5-Amino-2-pyridyl 1-thioglycosides in synthesis of analogs of glycosyltransferases substrates. *Bioorg. Chem.* **2009**, *37*, 77–83.
78. Montalbetti, Ch. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
79. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
80. Windridge, G.; Jorgensen, E., C. 1-Hydroxybenzotriazole as a racemization-suppressing reagent for the incorporation of im-benzyl-L-histidine into peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *23*, 6318–6319.
81. Butterworth, J. F.; Moran, J. R.; Whitesides, G. M.; Strichartz, G. R. Limited nerve impulse blockade by "leashed" local anesthetics. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1295–1302.
82. W. Chu, Z. Tu, E. McElveen, J. Xu, M. Taylor, R.R. Luedtke, R.H. Mach, Synthesis and in vitro binding of N-phenyl piperazine analogs as potential dopamine D<sub>3</sub> receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 77–87.
83. Kaminski, Z.J. 2-Chloro-4, 6-dimethoxy-1,3,5-triazine. A new coupling reagent for peptide synthesis. *Synthesis* **1987**, *10*, 917–920.
84. Kaminski, Z.J.; Paneth, P.; Rudzinski, J. A study on the activation of carboxylic acids by means of 2-chloro-4, 6-dimethoxy-1, 3, 5-triazine and 2-chloro-4, 6-diphenoxy-1,3,5-triazine. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 4248–4255.
85. Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, K.; Tani, S. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol-and water-soluble condensing agent: DMT-MM. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1551–1558.
86. [H2] Pastuch-Gawolek, G.; Chaubey, B.; Szewczyk, B.; Król, E. Novel thioglycosyl analogs of glycosyltransferase substrates as antiviral compounds against classical swine fever virus and hepatitis C virus. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 247–262.
87. Zhao, M.; Li, J.; Song, Z.; Desmond, R.; Tschaen, D.M.; Grabowski, E.J.; Reider, P.J.; A novel chromium trioxide catalyzed oxidation of primary alcohols to the carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5323–5326.
88. Epp, J.B.; Widlanski, T.S. Facile preparation of nucleoside-5'-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293–295.

89. Kappe, C.O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250–6284.
90. Paolini, I.; Nuti, F.; de la Cruz Pozo-Carrero, M.; Barbetti, F.; Kolesińska, B.; Kamiński, Z.; Chelli, M.; Papini, A.M. A convenient microwave-assisted synthesis of N-glycosyl amino acids. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2901–2904.
91. [H7] Komor, R.; Pastuch-Gawolek, G.; Sobania, A.; Jadwiński, M.; Szeja, W. Application of different  $\alpha$ -1-thioglycosides preparation methods in synthesis of 5-nitro-2-pyridyl 1-thioglycosides – substrates in synthesis of conjugates with uridine moiety. Part I. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2012**, *69*, 1259–1269.
92. Ying, L.; Gervay-Hague, J. Synthesis of N-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)glycopyranosylamine uronic acids. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 367–375.
93. [H4] Pastuch-Gawolek, G.; Malarz, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musioł, M.; Serda, M.; Czaplinska, B.; Musioł, R. Small molecule glycoconjugates with anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 130–144.
94. [H3] Pastuch-Gawolek, G.; Pleśniak, M.; Komor, R.; Byczek-Wyrostek, A.; Erfurt, K.; Szeja, W. Synthesis and preliminary biological assay of uridine glycoconjugate derivatives containing amide and/or 1,2,3-tiazole linkers. *Bioorg. Chem.* **2017**, *72*, 80–88.
95. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
96. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin W.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
97. Liang, L.; Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (AuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
98. Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Józwiak, K. Click Chemistry for drug development and diverse chemical–biology applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.
99. [H1] Król, E.; Pastuch-Gawolek, G.; Chaubey, B.; Brzuska, G.; Erfurt, K.; Szewczyk, B. Novel uridine glycoconjugates, derivatives of 4-aminophenyl 1-thioglycosides, as potential antiviral compounds. *Molecules* **2018**, *23*, 1435.
100. Driguez, H.; Szeja, W. Facile Synthesis of 1,2-trans-Nitrophenyl-1-Thioglycopyranosides. *Synthesis* **1994**, *12*, 1413–1414.
101. McDonald, F. E.; Wu, M. Stereoselective synthesis of L-oligose trisaccharide via iterative alkynol cycloisomerization and acid-catalyzed glycosylation. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3979–3981.
102. Rohr, J.; Wohler, S.-E.; Oelkers, C.; Kirschning, A.; Ries, M. Biosynthetic short activation of the 2,3,6-trideoxysugar rhodinose. *Chem. Commun.* **1997**, 973–974.
103. [H5] Komor, K.; Szeja, W.; Komor, R.; Pastuch-Gawolek, G.; Thiem, J. Synthesis of fucosylated uridine conjugates as potential glycosyltransferase inhibitors. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **2014**, *71*, 1083–1089.
104. Vidal, S.; Bruyère, I.; Malleron, A.; Augé, C.; Praly, J.-P. Non-isosteric C-glycosyl analogues of natural nucleotide diphosphate sugars as glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *14*, 7293–7301.
105. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Of Immunological Methods*, **1983**, *65*, 55–63.

106. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314.
107. Haber, R. S.; Rathan, A. Weiser, K. R.; Pritsker, A.; Itzkowitz, S. H.; Bodian, C.; Slater, G.; Weiss, A.; Burstein, D.E. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: A marker for poor prognosis. *Cancer* **1998**, *83*, 34–40.
108. Calvaresi, E. C.; Hergenrother, P. J. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2319–2333.
109. Murray, R. D.; Ailabouni, A.; Heitlinger, L. A.; Li, B. U. K.; McClung, H. J.; Powers, P.; Gutt, J.; Kien, L. Galactose-containing carbohydrates are preferentially absorbed in the neonatal pig colon. *Pediatr. Res.* **1996**, *39*, 656–660.
110. Evans, R. C. ; Fear, S.; Ashby, D.; Hackett, A.; Williams, E.; van der Vliet, M.; Dunstan, F. D. J.; Rhodes, J. M. Diet and colorectal cancer: an investigation of the lectin/galactose hypothesis. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1784–1792.
111. Kumamoto, K.; Goto, Y.; Sekikawa, K.; Takenoshita, S.; Ishida, N.; Kawakita, M.; Kannagi, R. Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4620–4627.

Gabriele Pastuch