

Autoreferat rozprawy doktorskiej

„Photosensitive antibiotics and cytotoxic agents”

Autor: mgr Kaja Sitkowska

Promotorzy: prof. Bernard Feringa, prof. Grzegorz Litwinienko

Stratingh institute for Chemistry oraz Pracownia Technologii Organicznych Materiałów Funkcjonalnych

Wersja Polska:

W niniejszej pracy opisane są badania ukierunkowane na zastosowanie światła w połączeniu z nowo zaprojektowanymi związkami czułymi na światło. Celem syntezy tych związków jest przeciwdziałanie oporności bakteryjnej i efektom ubocznym chemoterapii oraz uzyskanie nowych, indukowanych światłem sond fluorescencyjnych do wizualizacji stresu oksydacyjnego, który często łączony jest z negatywnymi zmianami w homeostazie komórek.

Rozdział 1 skoncentrowany jest na tematyce zastosowania światła w biologii. Po krótkim wstępie dotyczącym właściwości i roli światła w procesach biologicznych, opisane są trzy główne grupy związków odpowiednich do tego typu zastosowań. Sondy fluorescencyjne znalazły zastosowanie w obrazowaniu procesów istotnych biologicznie w komórkach. Składają się one z fluorofora, którego właściwości zmieniają się w zależności od stanu związanego z nim receptora, który ma za zadanie selektywnie wiązać się z określonymi molekułami. Sondy fluorescencyjne zdolne do rozpoznawania komórek nowotworowych prawdopodobnie uratowały już wiele istnień, oferując znaczną pomoc chirurgom w wykrywaniu zmian nowotworowych niewidocznych dla ludzkiego oka.

Grupy fotozabezpieczające oraz przełączniki molekularne, mimo różnic w mechanizmie działania, zostały z powodzeniem zastosowane jako ugrupowania do modyfikacji leków, zapewniając im fotoczułość. Tego typu związki pozwalają na kontrolę aktywności leków przez światło i wykazują potencjał przeciwdziałania oporności bakteryjnej, zapewniając warunki bezpiecznego przechowywania (w nieaktywnej formie) oraz możliwość ich aktywacji w wybranym miejscu działania. Ta właściwość jest szczególnie ważna przy ograniczaniu efektów ubocznych związanych z użyciem antybiotyków, jak i chemioterapeutyków na zdrowe tkanki. Pomimo, iż wiele związków mogących spełniać to kryterium zostało już opisane w literaturze, niestety żaden z nich nie przekroczył etapu „*proof of concept*”. Ostatnia sekcja wstępu traktuje o pozostałych wyzwaniach i przydatności badań opisanych w tej pracy do ich rozwiązania.

W rozdziale drugim został opisany protokół łatwego otrzymywania grup fotozabezpieczających dla amin opartych na ugrupowaniu BODIPY. Związki te zostały zaprojektowane jako narzędzia do dalszego rozwoju syntezy fotoczułych leków oraz dróg ich otrzymywania, a także stanowią podstawę, na bazie której przeprowadzona została reszta badań opisanych w tej pracy. Otrzymane związki, zawierające ugrupowanie karbaminianowe pomiędzy chromoforem, a modelowymi aminami zostały naświetlone zielonym światłem ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$). Opisany został również proces ich fotoodbezpieczania w środowisku wodnym. Okazało się, że wspomniane grupy fotozabezpieczające mogły zostać usunięte w przeciągu 10 minut od początku naświetlania prowadząc do powstania pożądaných amin. Nie zauważono żadnej

znaczącej degradacji opisywanych związków podczas przechowywania ich bez dostępu światła przez 24 godziny.

Rozdział 3 jest kontynuacją rozdziału 2. Otrzymane związki są analogiczną serią grup fotozabezpieczających, bazujących na ugrupowaniu BODIPY do zabezpieczania amin, które mogą być odbezpieczane światłem czerwonym, wchodzącym w zakres tzw. „okna terapeutycznego” ($\lambda_{\max} = 650$ nm). Badania nad procesem fotoodbezpieczania po raz kolejny wykazały szybkie i przebiegające bez powstawania produktów ubocznych reakcje zabezpieczonych amin ze światłem widzialnym oraz brak znaczącej degradacji w środowisku wodnym przed 24 godziny przechowywania bez dostępu światła. Najbardziej „obietująca” spośród otrzymanych grupa zabezpieczająca została użyta do zabezpieczenia dopaminy, neurotransmitera i leku nasercowego. Badania biologiczne nad tym związkiem są prowadzone przez grupę prof. Petera van der Meer (UMCG).

W rozdziale 4 opisane zostały próby wykorzystania reakcji multikomponentowych (MCR) do syntezy związków zabezpieczonych grupami fotozabezpieczającymi BODIPY. Celem badań zawartych w tym rozdziale była rozszerzenie zasosowań protokołu syntezy tego typu związków, ułatwiając budowanie bibliotek w celu uniknięcia wykonywania dodatkowej optymalizacji dla każdego z substratów z osobna, jak to miało miejsce w rozdziałach 2 i 3. Wybrana MCR, reakcja Passeriniego, pozwala na otrzymanie pożądanych związków ze średnimi lub dobrymi wydajnościami (<40%). Badania indukowanego światłem odbezpieczania (uwolnienia) transportowanego leku (tzw. *cargo*) związanego z nośnikiem podczas MCR wykazały, że czasy potrzebne do pełnego odbezpieczania są stosunkowo długie (godzina lub dłużej). Badania te pokazują, że zgodnie z przewidywaniami, MCR są potężnym narzędziem do budowania bibliotek związków zabezpieczonych grupami fotozabezpieczającymi, ale dobór odpowiednich substratów jest problemem, który wymaga przeprowadzenia dalszych badań, zanim opisywana metoda będzie w pełni użyteczna.

Rozdział 5 zawiera praktyczne przykłady użyteczności grup fotozabezpieczających do przeciwdziałania oporności bakteryjnej oraz skutkom ubocznym chemioterapii. W pierwszej części rozdziału opisane są przeprowadzone przez nas próby otrzymania fotoodbezpieczalnych pochodnych Mitomycyny C, znanego chemioterapeutyku i antybiotyku. Mimo, iż synteza pożądanych związków została zwieńczona sukcesem, ich naświetlanie (światłem o $\lambda_{\max} = 365, 523$ lub 650 nm) nie powodowało uwalniania aktywnej formy leku. W drugiej części rozdziału opisane są nasze próby otrzymania dwóch fotozabezpieczalnych pochodnych Neomycyny B oraz badania właściwości fotochemicznych jednej z nich (Neomycyny B zabezpieczonej grupą *orto*-nitrobenzylową). Wyniki wstępne świadczą o zachowanej aktywności leku przeciw bakteriom *E. Coli* po fotoodbezpieczeniu tego związku, niestety częściowa aktywność została zaobserwowana także dla jego zabezpieczonej formy. Mieliśmy nadzieję rozwiązać ten problem poprzez przygotowanie analogicznej pochodnej Neomycyny B zabezpieczonej ugrupowaniem BODIPY, jednak synteza ta zakończyła się niepowodzeniem z powodu degradacji materiału. W celu rozwiązania tego problemu konieczne są dalsze badania.

Rozdział 6 skoncentrowany jest na trzeciej kategorii związków aktywowanych światłem – sondach fluorescencyjnych. Celem tych badań było otrzymanie sondy bazującej na ugrupowaniu BODIPY do wizualizacji i kwantyfikowania stresu oksydacyjnego w komórkach. W rozdziale opisano otrzymywanie

ligandów dla nanocząstek złota z wbudowanym fluoroforem połączonym z ugrupowaniami fenolowymi/katecholowymi jako sensorami reaktywnych form tlenu (ROS). Otrzymane związki, styrylowe pochodne BODIPY zawierające wolne lub zabezpieczone grupy OH zostały poddane badaniom UV-Vis oraz elektrodą Clarka w celu opisanie ich właściwości jako potencjalnych sond do wykrywania ROS. Drastyczne zmiany obserwowane w widmach absorpcyjnych otrzymanych związków w obecności wybranych ROS w modelowym układzie micelarnym powodują, że związki te mogą być zastosowane jako pułapki rodnikowe dla rodników peroksyłowych.

Wersja angielska:

This thesis describes research towards the use of light in combination with newly designed photosensitive compounds to counter bacterial resistance and the adverse effects of chemotherapy as well as novel light-induced fluorescent probes for visualization of oxidative stress in cells which is often connected to malicious changes in their homeostasis.

Chapter 1 concentrates on the topic of using light in biology. After a brief introduction on the properties and the role of light in biological processes, three main groups of compounds suitable for such application are described. Fluorescent probes, consisting of a fluorophore whose properties change depending on the status of a bound receptor selective towards specific molecules, have found their application in the visualization of biologically relevant processes in cells. Fluorescent probes targeting cancer cells have already potentially saved many lives, providing much help to the surgeons in finding small tumours, normally not visible by human eye. Photoprotecting groups and molecular switches, albeit different in their mechanism of action, have been successfully employed as moieties for modifying drugs to gain photosensitivity. These new compounds allow for the control of the activity of drugs by light and hold the promise of countering bacterial resistance by providing the means of safe storage (in the non-active form) and the possibility of their activation only at the site of action. The later property is also of great importance for limiting the adverse effects of both antibiotics and chemotherapy on healthy tissues. Although many examples of such compounds have been already reported, none of them has exceeded the proof of concept stage yet and the closing section of the introduction gives insight on the remaining challenges and how the research contained in this thesis will attempt to address them.

In Chapter 2, a protocol for the easy preparation of BODIPY based photoprotecting groups for amines is presented. These compounds were made as tool compounds to create further photoreleasable drugs and the developed pathways will be the foundation upon which the others contained within this thesis will be built upon. The compounds, bearing a carbamate linker between the chromophore and studied amines were irradiated with green light ($\lambda_{\max} = 520$ nm) and their photocleavage process in aqueous media was studied. It turned out that the PPGs could be selectively cleaved in 10 min leading to the formation of the desired amines. No significant degradation was observed when the samples of the compounds were stored in the dark for 24 hours.

Chapter 3 is a follow up of the system developed in Chapter 2. The compounds obtained therein are an analogous series of BODIPY based photoprotecting groups for amines, which are able to be cleaved with red light in the therapeutic window region ($\lambda_{\max} = 650$ nm). The studies on the photocleavage process

showed again fast and clean reactions of the protected amines with visible light and the lack of significant degradation in the dark over 24 hours in aqueous media. The most promising PPG was used for the protection of dopamine, a common neurotransmitter and cardiac drug. Biological studies on this compound will be performed by the group of Prof. Peter van der Meer (University Medical Center Groningen).

In Chapter 4, our attempts at using multicomponent reactions for the synthesis of compounds protected with BODIPY photoprotecting groups are described. The aim of the study in this chapter was to universalize the protocol for the synthesis of such compounds making the development of compound libraries far easier while avoiding having to perform additional individual optimization for each of the substrates, as was necessary for the PPGs introduced in Chapter 2 and 3. The chosen MCR, the Passerini reaction, yields the desired compounds in good to moderate yields (<40%). The light driven release of the cargo integrated to the carrier during the MCR was also studied and it was shown that the times needed for the full photocleavage of the obtained compounds was relatively long. This indicates that, while the MCR proved to be the powerful compound library building tool it was hoped to be, the choice of substrates used will need reconsideration before this method is fully viable.

Chapter 5 provides tangible examples of the usefulness of photoprotecting groups for countering bacterial resistance and the adverse effects of chemotherapy. In the first part of this chapter, our attempts at the preparation of photocleavable derivatives of Mitomycin C, a known chemotherapeutic and antibiotic, are described. Even though the syntheses of the desired compounds were successful, it turned out that the irradiation with light ($\lambda = 365, 523$ or 650 nm) was not yielding the desired compounds. In the second part of this chapter, our attempts towards the synthesis of two PPG-protected derivatives of Neomycin B and the study of the photochemical properties of one of these are described (*o*-nitrobenzyl protected Neomycin B). Despite the promising initial results it yielded in terms of retained activity towards *E. coli* after photocleavage, residual activity of the unprotected compound could also be observed. We hoped to solve this problem by preparing an analogous BODIPY derivative of Neomycin B, but in our hands the synthesis was unsuccessful due to degradation and further work towards this end is needed.

Chapter 6 focuses on the third category of photoactivable compounds, fluorescent probes. The goal of this study was to develop a BODIPY based probe for the visualization and quantification of oxidative stress in cells. The development of ligands for a gold nanoparticle carried fluorophore attached to a phenol /catechol based ROS sensor is described. The obtained compounds, styryl BODIPYs bearing free or protected OH groups were subjected to UV-Vis and Clark electrode studies to determine their potential as ROS probes. Due to the drastic changes in the absorbance spectra of the obtained compounds in the presence of chosen ROS in model micellar systems, they can serve as trapping agents for peroxy radicals.