

# BIOKONIUGATY ANTYBIOTYKÓW JONOFOROWYCH – CELE, STRATEGIE SYNTEZY I WŁAŚCIWOŚCI

BIOCONJUGATES OF IONOPHORE ANTIBIOTICS  
– GOALS, SYNTHESIS STRATEGIES AND PROPERTIES

**Michał Antoszczak<sup>\*</sup>, Marta Kordylas, Adam Huczyński**

*Pracownia Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemii,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań  
<sup>\*</sup>e-mail: michant@amu.edu.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Aktywność biologiczna monenzyny i salinomycyny
  - 1.1. Aktywność przeciwbakteryjna
  - 1.2. Aktywność przeciwnowotworowa
2. Biokoniugaty jonoforów
  - 2.1. Biokoniugaty z aminokwasami serii *L*
  - 2.2. Biokoniugaty z alkaloidami kory chinowca
  - 2.3. Biokoniugaty z flawonoidami
  - 2.4. Biokoniugaty z nukleozydami

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr Michał Antoszczak** – w 2016 roku uzyskał stopień doktora (promotor – dr hab. Adam Huczyński). Od 2017 roku zatrudniony na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Laureat stypendiów naukowych, między innymi stypendium Narodowego Centrum Nauki w programie Etiuda, Prezydenta Miasta Poznania dla młodych badaczy, Fundacji UAM, stypendium im. Jana Kulczyka. Autor 20 publikacji naukowych z zakresu chemii medycznej oraz chemii bioorganicznej, a także 4 rozdziałów w książkach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym.



**Marta Kordylas** – magistrantka w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemii UAM (promotor – dr hab. Adam Huczyński). W ramach pracy magisterskiej zajmuje się syntezą nowego rodzaju biokoniugatów 5-fluorouracylu ze związkami pochodzenia naturalnego.



**Dr hab. Adam Huczyński** w 2008 roku uzyskał stopień doktora (promotor – prof.dr hab. Bogumił Brzezinski), w 2013 roku habilitował się, od 2016 roku zatrudniony na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Wydziale Chemii UAM. Jego zainteresowania naukowe związane są z chemiczną modyfikacją związków pochodzenia naturalnego, badaniami natury wiązań wodorowych i procesu kompleksowania kationów metali. Nagrodzony między innymi nagrodą im. Wiktora Kemuli przyznaną przez Polskie Towarzystwo Chemiczne za najlepszą pracę habilitacyjną, uzyskał stypendium Ministra Nauki

i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców, stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych uczonych, stypendium naukowe Miasta Poznania. Autor ponad 100 publikacji z listy JCR.

## ABSTRACT

Polyether ionophore antibiotics (ionophores) represent a large group of naturally-occurring lipophilic compounds which are able to form complexes with the metal cations and transport them across the lipid membranes. This process disturbs the intercellular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  concentration gradient and intracellular pH, and leads to the mitochondrial damages, cell swelling, vacuolization and finally to apoptosis process. For this reason, ionophores are commonly used in veterinary medicine as the non-hormonal growth-promoting as well as coccidiostatic agents.

In this group particularly interesting are monensin and salinomycin (Fig. 1) because of their proved anti-tumour activity, including efficiency against multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells of different origin. Improved synthetic derivatives of both polyether ionophores are thus of considerable current interest. Selective derivatization of these structures whose display multiple reactive functional groups and, in the case of salinomycin, a sensitive tricyclic spiroketal ring system is however non-trivial. Even so, semi-synthetic analogs reported to date includes *i.a.* selective derivatization of the carboxyl group, the three hydroxyl groups, the ketone group, the alkene, and epimerization of the characteristic tricyclic salinomycin unit (for more details see: M. Antoszczak, A. Huczyński, B. Brzezinski, *Wiad. Chem.*, 2017, **71**, 629).

On the other hand, as part of the original program to develop innovatory anti-cancer pro-drugs and prompted by the idea that cancer cells may be individually effectively killed by monensin and salinomycin, a very interesting direction of research is bioconjugation of these ionophores. In this context, our review article is focused on the possible role of hybrids of both ionophore antibiotics with other biologically active substances (natural amino acids, *Cinchona* alkaloids, flavonoids, nucleosides) in anti-bacterial and anti-cancer treatment, and gives an overview of their properties.

Keywords: ionophore antibiotics; ionophores; bioconjugation; hybrids; antibacterial activity; anticancer activity

Słowa kluczowe: antybiotyki jonoforowe; jonofory; biokoniugacja; hybrydy; aktywność przeciwbakteryjna; aktywność przeciwnowotworowa

---

---

## WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe obejmują dużą grupę schorzeń, które charakteryzują się niekontrolowanym przez mechanizmy fizjologiczne mnożeniem się komórek. Do najbardziej niepożądanych cech chorób nowotworowych należy niewątpliwie zdolność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych lub odległych narządów, a także naciekanie do okolicznych tkanek. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia ponad osiem milionów ludzi umiera każdego roku z powodu tychże chorób. Co więcej, przewiduje się, że liczba osób, u których zdiagnozuje się nowotwór, będzie systematycznie wzrastać [1].

Pomimo że w ostatnich latach onkolodzy i naukowcy pokonali wiele trudności w walce z nowotworami, pacjenci ciągle czekają na opracowanie efektywnych metod zwalczania tej grupy chorób. Chemioterapia, której działanie opiera się na zahamowaniu podziału i wzrostu komórek nowotworowych, jest skuteczna w zwalczaniu wielu rodzajów nowotworów, jednak nadal pozostaje szerokie spektrum chorób nowotworowych, wobec których metoda ta jest nieskuteczna [2, 3].

Co więcej, pacjenci z chorobą nowotworową mają zwykle upośledzony system odpornościowy i z tego powodu są szczególnie podatni na wszelkiego rodzaju infekcje, między innymi infekcje bakteryjne. Onkolodzy, jako druga grupa lekarzy po chirurgach, bardzo często stykają się z opornością na działanie antybiotyków, która występuje u co czwartego pacjenta leczonego za pomocą chemioterapii [7]. W związku z napotykanymi trudnościami w leczeniu nowotworów poszukiwanie nowych i skutecznych leków w zwalczaniu chorób nowotworowych stanowi wciąż wyzwanie dla naukowców.

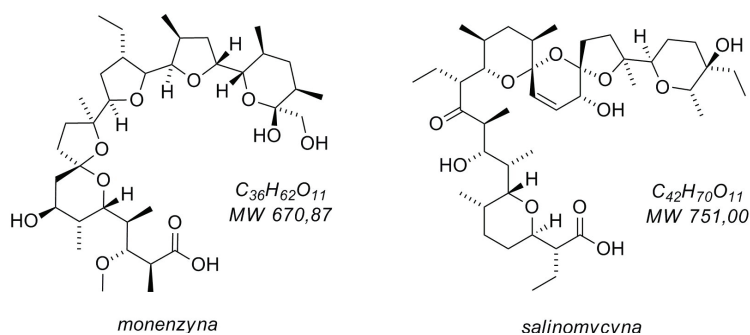
W ostatnich dziesięcioleciach w leczeniu nowotworów stosowano naturalne związki zarówno w niezmodyfikowanej chemicznie postaci, jak i różne ich pochodne uzyskane przez chemiczną modyfikację grup funkcyjnych. Przykładem takich związków są: bleomycyna, daunorubicyna, doksorubicyna, kombretastatyna A-4, winblastyna i winkrystyna, na uwagę zasługują również kamptotecyna i taksol, które stosuje się jako leki działające między innymi przeciwko nowotworom okrężnicy, jajników oraz piersi [4–6].

Historia odkryć nowych leków chemioterapeutycznych jasno pokazuje, że najłatwiejszą drogą do odkrycia nowych środków przeciwnowotworowych jest chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego. W grupie tej szczególnie interesujące są antybiotyki jonoforowe, wśród których na uwagę zasługują zwłaszcza dwa z nich – monenzyna oraz salinomycyna.

## 1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MONENZYNY I SALINOMYCYNY

Monenzyna (Rys. 1) została wyizolowana pierwszy raz w 1967 roku ze *Streptomyces cinnamonensis* i była pierwszym związkiem z grupy jonoforów, którego chemiczną strukturę dokładnie opisano i wyjaśniono [8]. Natomiast w 1979 roku po raz pierwszy przeprowadzono syntezę totalną tego związku [9]. Jak dotąd są znane trzy homologi monenzyny, zaś najczęściej spotykaną formą jest monenzyna A.

Drugim z opisywanych związków należących do antybiotyków jonoforowych jest salinomycyna (Rys. 1), która została wyizolowana pierwszy raz ze *Streptomyces albus* w 1974 roku [10]. W 1981 roku opisano pierwszą syntezę totalną [11], którą z powodzeniem rozwijano w kolejnych latach [12]. W 2012 roku zaproponowano ścieżkę biosyntezy salinomycyny [13].



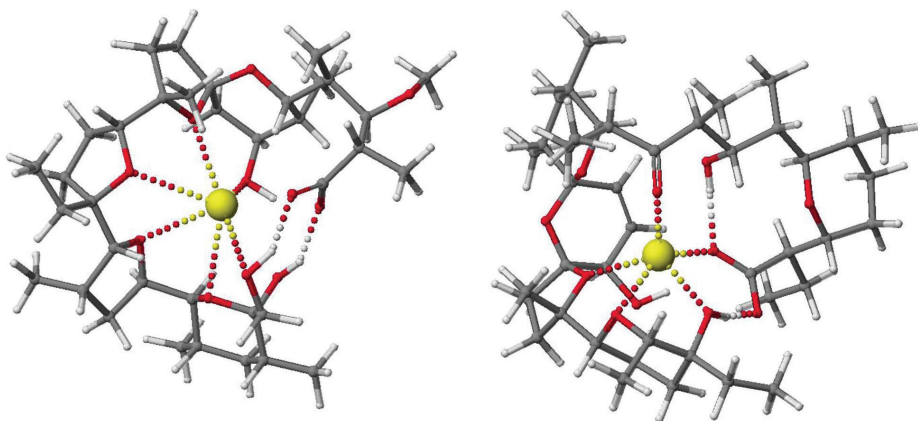
Rysunek 1. Struktura chemiczna monenzyny i salinomycyny  
 Figure 1. The chemical structure of monensin and salinomycin

Obie biocząsteczki w swojej strukturze zawierają jedenaście atomów tlenu, które wchodzi w skład różnych grup funkcyjnych. W strukturze salinomycyny występuje ponadto charakterystyczny 6-6-5 bis-spiroketalowy system pierścieni usztywniający całą cząsteczkę (Rys. 1), który rzadko występuje wśród innych naturalnie występujących związków [14, 15].

Zarówno monenzyna, jak i salinomycyna występują w formie otwartołańcuchowej. Warto jednak zauważyć, że dzięki obecności grupy karboksylowej na jednym końcu cząsteczki i grupy hydroksylowej na drugim możliwe jest utworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych typu „głowa do ogona”. Proces ten prowadzi do utworzenia pseudocyklicznej struktury, w której atomy tlenu skierowane są do jej wnętrza, dzięki czemu związki te mogą łatwo kompleksować kationy (głównie  $Na^+$  i  $K^+$ ). Z drugiej strony, zewnętrzna część cząsteczki pozostaje hydrofobowa, co pozwala na łatwe przenikanie utworzonych kompleksów przez błony biologiczne (Rys. 2) [16, 17].

Właściwość ta pozwala na zaklasyfikowanie monenzyny i salinomycyny do dużej grupy naturalnie występujących związków, tzw. antybiotyków jonoforowych (jonoforów). Charakterystyczną cechą tych związków jest zdolność do wiązania

kationów i przenoszenia ich przez dwuwarstwy lipidowe ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza komórki zgodnie z elektroneutralnym bądź elektrogenicznym (elektrogennym) mechanizmem transportu [18–20].



Rysunek 2. Struktura soli sodowej monenzyny (po lewej stronie) i soli sodowej salinomycyny (po prawej stronie)

Figure 2. The structure of monensin sodium salt (on the left side) and salinomycin sodium salt (on the right side)

### 1.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA

Sole sodowe monenzyny i salinomycyny są powszechnie używane w weterynarii jako dodatki do paszy, pełniąc rolę niehormonalnych promotorów wzrostu bydła oraz kokcydiostatyków [17]. Wysoką aktywność przeciwbakteryjną tych związków można wytłumaczyć wpływem na wewnątrzkomórkową homeostazę sodowo-potasową i komórkowe pH, co prowadzi do znaczących zaburzeń procesów komórkowych skutkujących śmiercią bakterii [21, 22].

Potwierdzono, że oba związki są aktywne przeciw bakteriom Gram-dodatnim, między innymi bakteriom z rodzaju *Bacillus*, *Micrococcus* oraz *Staphylococcus* [23]. Jednocześnie aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich jest o wiele większa niż wobec Gram-ujemnych. Może to być wyjaśnione różnicą w budowie pomiędzy tymi bakteriami – ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych ma bardziej złożoną budowę i więcej warstw niż ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich [24].

Monenzyna i salinomycyna wykazują również ograniczoną aktywność przeciw niektórym rodzajom grzybów, np. *Candida albicans*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* i *Saccharomyces cerevisiae* [25, 26].

Dodatkowo ustalono, że oba jonofory wykazują interesujące właściwości przeciwwirusowe. Udowodniono na przykład, że monenzyna hamuje replikację wirusów odpowiedzialnych za pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej i wirusa Sindbis (ang. *Sindbis virus*, SINV) [27, 28]. W innych badaniach potwierdzono, że monenzyna

hamuje penetrację wirusa gorączki lasu Semliki (ang. *Semliki Forest virus*, SFV) do komórek docelowych [29]. Z drugiej strony udokumentowano, że salinomycyna wykazuje silną aktywność przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV) [30].

Testy *in vitro* wykazały, że monenzyna jest aktywna wobec *Plasmodium falciparum*, jednego z głównych czynników wywołujących malarię u ludzi, i jednocześnie wykazuje w tych badaniach zdecydowanie większą aktywność w porównaniu do aktywności leku przeciwmalarycznego – chlorochiny. Z kolei testy *in vivo* na myszach zakażonych *Plasmodium viquei petteri* udowodniły, że monenzyna wyleczyła wszystkie zainfekowane myszy, gdy ją zastosować w dawce 10 mg kg<sup>-1</sup> [31, 32].

Stwierdzono również, że obydwa jonofory są silnymi lekami przeciw kokcydiozie, chorobie pasożytniczej wywołanej przez kokcydia z rodzaju *Eimeria*. Są efektywne wobec *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunette*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* i *Eimeria tenella*, zaś ich aktywność jest większa od aktywności powszechnie używanych leków kokcydiostatycznych [33].

Dodatkowo, poza weterynaryjnym zastosowaniem monenzyny i salinomycyny jako środków przeciw kokcydiozie oraz jako promotorów wzrostu drobiu i bydła, wykazano, że obydwa jonofory efektywnie i selektywnie hamują właściwości najróżniejszych komórek nowotworowych. Te interesujące odkrycia zostaną opisane w kolejnym podrozdziale niniejszego artykułu.

## 1.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że monenzyna zapobiega wzrostowi komórek raka prostaty. W badaniach przesiewowych został zbadany efekt niemal 5000 dobrze znanych leków i związków lekopodobnych. Cztery z nich, w tym monenzyna, selektywnie hamowały wzrost komórek nowotworowych prostaty w nanomolowych stężeniach, nie wykazując znaczącego wpływu na wzrost zdrowych ludzkich komórek nabłonka prostaty. Dalsze badania wykazały, że monenzyna powoduje śmierć komórek nowotworowych prostaty poprzez redukcję poziomu receptorów i białek androgenowych mRNA, zwiększając tym samym produkcję reaktywnych form tlenu i powodując uszkodzenia DNA. Ponadto stwierdzono, że efekty te nasilają się dzięki skojarzonemu leczeniu z użyciem środków przeciwandrogennych, zapobiegając wzrostowi komórek nowotworu prostaty [34].

Udowodniono, że monenzyna hamuje proces namnażania się komórek wielu innych rodzajów nowotworów, włączając w to nieprawidłowe komórki okrężnicy, chłoniaka i szpiczaka, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, ale także przez utratę mitochondrialnego potencjału transbłonowego [35–37]. Stwierdzono również, że połączona terapia monenzyny z TRAIL, innym aktywnym przeciwnowotworowo środkiem, powoduje przezwyciężenie lekooporności w komórkach glejaka [38].



Ze względu na dużą lipofilowość cząsteczki monenzyny zaprojektowane zostały odpowiednie systemy dla efektywnego dostarczenia i wykorzystania tego jonoforu. W tej grupie szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie jako transporterów nanocząstek i modyfikowanych liposomów. Wykazano, że monenzyna włączona do liposomów wywołuje apoptozę *in vitro* i *in vivo* w opornym na doksorubicynę gruczolakoraku (nowotworze gruczolowym) piersi, nowotworze jelita grubego, złośliwym międzybłoniaku i komórkach glejaka, gdy ją stosować w skojarzonym leczeniu z innymi specyficznymi substancjami [39, 40].

Jednym z najtrudniejszych problemów, które musi rozwiązać współczesna medycyna onkologiczna, jest skuteczna walka z macierzystymi komórkami nowotworowymi, a więc prekursorami innych komórek nowotworowych, odgrywającymi kluczową rolę w powstawaniu nowotworów. Teoria macierzystych komórek nowotworowych zakłada, że wśród populacji komórek nowotworowych znajduje się niewielka subpopulacja komórek macierzystych, które odpowiedzialne są za nawroty choroby, a także za jej rozsiew (metastazę) [41].

W standardowej terapii najczęściej stosowane chemioterapeutyki eliminują komórki będące w cyklu rozwojowym, ale macierzyste komórki nowotworowe nie są w tym cyklu, są odporne zarówno na chemioterapię, ponieważ zawierają między innymi większe ilości białek odpowiedzialnych za usuwanie leków z komórek, jak również na radioterapię z powodu znacznej ilości w ich wnętrzu zredukowanego glutationu i białek odpowiedzialnych za ochronę przed reaktywnymi formami tlenu powstającymi podczas napromieniania [41]. Przez tę oporność macierzyste komórki nowotworowe powodują nawrót choroby nowotworowej.

W tym kontekście badania z użyciem salinomycyny zaczęły cieszyć się wzmożonym zainteresowaniem od 2009 roku, w którym to roku badania przesiewowe przeprowadzone na około 16000 substancji biologicznie czynnych (w tym wielu lekach przeciwnowotworowych) wykazały, że tylko 32 badane związki zdolne były uśmiercać macierzyste komórki nowotworu piersi, a wśród nich najbardziej aktywna okazała się wspomniana salinomycyna. Związek ten eliminował komórki macierzyste nowotworu piersi *in vitro* i hamował wzrost guza sutka *in vivo* ze 100-krotnie większą selektywnością w porównaniu z powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym – taksolem [42].

W ostatnich latach udokumentowano, że salinomycyna wywołuje apoptozę wielu ludzkich komórek nowotworowych, włączając w to komórki białaczkowe, kostniaka zarodkowego, komórki nowotworowe płuc, jelita grubego, żołądka, wątroby, jamy nosowo-gardłowej i prostaty. Ponadto udowodniono uwrażliwiające działanie salinomycyny na komórki nowotworowe w połączeniu z radioterapią lub różnymi środkami chemioterapeutycznymi, w tym: kolchicyną, gemcytabiną, imatynibem, tamoksyfenem i winblastyną [43].

Należy podkreślić, że w 2012 roku potwierdzono terapeutyczny efekt stosowania salinomycyny wśród chorych z inwazyjnym nowotworem głowy, szyi, piersi i jajników. Monoterapia z użyciem salinomycyny, stosowanej w dawce 200–250  $\mu\text{g kg}^{-1}$



podawanej dożylnie co drugi dzień przez trzy tygodnie, powodowała zahamowanie postępu choroby bez wystąpienia poważnych, długotrwałych działań niepożądanych często spotykanych przy zastosowaniu standardowych chemioterapeutyków, takich jak: mielosupresja (zmniejszenie liczby komórek szpiku kostnego), neutropenia (zmniejszenie liczby granulocytów), problemy żołądkowo-jelitowe, zakrzepowozatorowe i neurologiczne. Nie odnotowano również takich skutków ubocznych, jak łysienie, nudności i wymioty.

Chociaż minęło blisko dziesięć lat od odkrycia właściwości przeciwnowotworowych salinomycyny, do tej pory dokładny mechanizm jej działania wobec komórek nowotworowych i macierzystych komórek nowotworowych nie został w pełni wyjaśniony. Proponowane mechanizmy obejmują między innymi wpływ na takie procesy, jak: hamowanie szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina, sygnalizacji Hedgehog i systemów wyrzutu leków, indukowanie wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu, uszkodzenie DNA, rozszczepienie polimerazy poli(ADP-rybozy), a także wiele innych procesów [43].

Do tej pory opublikowano ponad 2000 artykułów naukowych opisujących wyjątkowe właściwości salinomycyny, z tego prawie połowę po przełomowym 2009 roku. Podstawowe dane dotyczące właściwości fizykochemicznych monenzyny i salinomycyny (oraz ich soli sodowych) zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka monenzyny i salinomycyny, a także ich soli sodowych  
Table 1. Characterization of monensin and salinomycin as well as their sodium salts

Parametr	Monenzyna	Sól sodowa monenzyny	Salinomycyna	Sól sodowa salinomycyny
Numer CAS	17090-79-8	22373-78-0	53003-10-4	55721-31-8
Wzór sumaryczny	$C_{36}H_{62}O_{11}$	$C_{36}H_{61}NaO_{11}$	$C_{42}H_{70}O_{11}$	$C_{42}H_{69}NaO_{11}$
Masa molowa	670,87 g mol <sup>-1</sup>	692,85 g mol <sup>-1</sup>	751,00 g mol <sup>-1</sup>	772,98 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura topnienia	103,0–105,0°C	267,0–269,0°C	112,5–113,5°C	140,0–142,0°C
pKa	6,6 (DMF)	–	6,5 (DMF)	–
Skręcalność optyczna	$[\alpha]_D^{25} + 47,7$ (c = 1,00 MeOH)	$[\alpha]_D^{25} + 57,2$ (c = 1,00 MeOH)	$[\alpha]_D^{25} - 63,0$ (c = 1,00 EtOH)	$[\alpha]_D^{25} - 37,0$ (c = 1,00 EtOH)

## 2. BIOKONIUGATY JONOFORÓW

Proces biokoniugacji, w którym dwie lub więcej bioaktywnych cząsteczek wiąże się za pomocą wiązania kowalencyjnego, jest jedną z najczęściej stosowanych strategii w opracowywaniu nowych leków (hybryd) o wyższej skuteczności biologicznego działania w porównaniu do komponentów wyjściowych. Biokoniugaty mogą zostać utworzone poprzez połączenie w jednej cząsteczce tylko biomolekuł lub mogą być

połączeniami biomolekuł z syntetycznymi małymi cząsteczkami, a powstałe w ten sposób hybrydy mogą zostać wykorzystane do badań interakcji biologicznych, testów biochemicznych, obrazowania *in vitro*, badań diagnostycznych lub przemysłowych [45, 46].

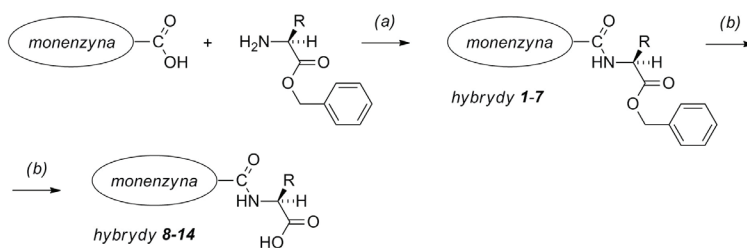
Należy jednak w tym miejscu podkreślić, że chemiczna modyfikacja antybiotyków jonoforowych nie należy do zadań łatwych. Cząsteczka salinomycyny ulega na przykład nieodwracalnemu procesowi rozpadu w kontakcie z silnymi kwasami lub zasadami, a także w przypadku nadmiernego ogrzewania [12]. Dlatego też modyfikacja chemiczna jonoforów, w tym ich biokoniugacja, musi zachodzić w łagodnych warunkach.

Do tej pory w literaturze naukowej opisano syntezę oraz aktywność biologiczną biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z aminokwasami serii *L* [47–49], alkaloidami kory chinowca [50], wybranymi flawonoidami [51] i nukleozydami [52, 53], z czego większość prac opublikowano w ostatnich pięciu latach. Synteza i aktywność biologiczna wymienionych hybryd została opisana w kolejnych podrozdziałach tego artykułu.

## 2.1. BOKONIUGATY Z AMINOKWASAMI SERII *L*

Po raz pierwszy syntezę biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami oraz struktury krystaliczne ich kompleksów z kationem sodu przedstawiono w 1988 roku [47]. Synteza tego typu hybryd jest interesującym obszarem badań z kilku powodów. Wykazano mianowicie, że aminokwasowe proleki, jak również ich pochodne, poprawiają słabą przepuszczalność przez błony biologiczne i rozpuszczalność, przedłużają uwalnianie, dystrybucję, ukierunkowanie i stabilność metaboliczną materiałów wyjściowych [54].

Cząsteczka monenzyny została skoniugowana z estrami benzyłowymi wybranymi aminokwasów serii *L* w obecności DCC (*N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu), który pełnił funkcję czynnika sprzęgającego i HOBt (1-hydroksybenzotriazolu) jako aktywatora tych reakcji (Schemat 1, związki **1–7**, wydajność 90–97%). Usunięcie benzyłowej blokady estrowej osiągnięto z dobrą wydajnością w atmosferze wodoru i w obecności aktywnego 5% palladu na węglu drzewnym jako katalizatora (Schemat 1, związki **8–14**, wydajność 83–99%). Analiza rentgenograficzna struktury kompleksu amidu monenzyny z *L*-tyrozyną (Schemat 1, związek **12**) z bromkiem sodu wykazała, że konformacja pochodnej różni się od konformacji kompleksu monenzyny z tą solą [47].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

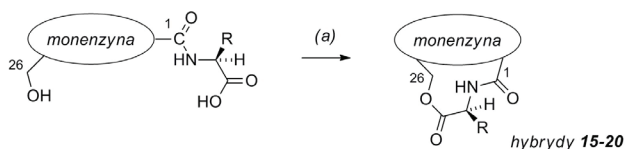
glicyna	R = H	hybryda 1 lub 8
alanina	R = CH <sub>3</sub>	hybryda 2 lub 9
seryna	R = CH <sub>2</sub> OH	hybryda 3 lub 10
feniloalanina	R = CH <sub>2</sub> Ph	hybryda 4 lub 11
tyrozyna	R = CH <sub>2</sub> PhOH	hybryda 5 lub 12
kwas asparaginowy	R = CH <sub>2</sub> COOR'	hybryda 6 (R' = Bn) lub 13 (R' = H)
kwas glutaminowy	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOR'	hybryda 7 (R' = Bn) lub 14 (R' = H)

Schemat 1. Synteza biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) monenzyna (1,0 ekw.), HOBT (1,2 ekw.), DCC (1,2 ekw.), ester benzylowy aminokwasu (1,3 ekw.), *N*-metylomorfolina (1,3 ekw.), THF, 5°C przez 12 godz.; (b) hybryda monenzyny z blokowanym aminokwasem (1,0 ekw.), H<sub>2</sub>, Pd 5%(C) (kat.), EtOH, 15–40 min. [47]

Scheme 1. Synthesis of monensin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) monensin (1.0 eq.), HOBT (1.2 eq.), DCC (1.2 eq.), amino acid benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid (or HCl) salt (1.3 eq.), *N*-methylmorpholine (1.3 eq.), THF, 5°C for 12 h; (b) appropriate monensin hybrid with amino acid benzyl ester (1.0 eq.), H<sub>2</sub>, Pd 5%(C) (cat.), EtOH, 15–40 min. [47]

Testy *in vivo* związków 8–14 (Schemat 1) na ich aktywność kokcydiostatyczną były przeprowadzone na kurczakach zarażonych *Eimeria tennella*. Wyniki badań pokazały, że wszystkie hybrydy są całkowicie nieaktywne wobec tych wysoce patogennych pasożytów [47].

W roku 1991 w tej samej grupie badawczej otrzymana została seria makrocyclicznych laktonów monenzyny z aminokwasami serii *L* (Schemat 2, związki 15–20, wydajność 67–84%). Biokoniugat monenzyny z glicyną zsyntezowano przy użyciu reakcji Coreya-Nicolaou, podczas gdy pozostałe makrolaktony otrzymano z dobrą wydajnością, wykorzystując efekt templatowy poprzez dodanie chlorku potasu do odczynników Coreya (Schemat 2) [48].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

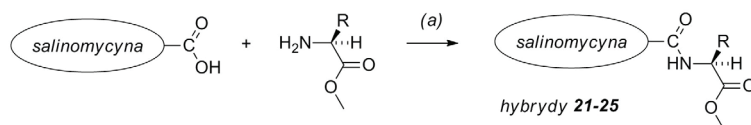
<i>glicyna</i>	R = H	<i>hybryda 15</i>
<i>alanina</i>	R = CH <sub>3</sub>	<i>hybryda 16</i>
<i>feniloalanina</i>	R = CH <sub>2</sub> Ph	<i>hybryda 17</i>
<i>tyrozyna</i>	R = CH <sub>2</sub> PhOH	<i>hybryda 18</i>
<i>kwask asparaginowy</i>	R = CH <sub>2</sub> COOH	<i>hybryda 19</i>
<i>kwask glutaminowy</i>	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	<i>hybryda 20</i>

Schemat 2. Laktonizacja biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) hybryda monenzyny z odblokowanym aminokwasem (1,0 ekw.), 2,2'-ditiopirydyna (10,0 ekw.), PPh<sub>3</sub> (10,0 ekw.), KCl w MeOH (1,0 ekw., za wyjątkiem biokoniugatu monenzyny z naturalną glicyną), benzen, tp (temperatura pokojowa) przez 8 godz., następnie wrzenie przez kolejne 4 godz. [48]

Scheme 2. Lactonization of monensin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) monensin hybrid with unblocked amino acid (1.0 eq.), 2,2'-dithiodipyridine (10.0 eq.), PPh<sub>3</sub> (10.0 eq.), KCl in MeOH (1.0 eq., except for monensin hybrid with natural glycine), benzene, rt (room temperature) for 8h, then boiling for next 4h [48]

Testy na aktywność przeciwbakteryjną przeciwko różnym bakteriom beztlenowym, w tym: *Eubacterium lentum*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *Propionibacterium acnes*, wykazały słabą aktywność tych związków. Co więcej, otrzymane makrolaktony nie wykazały aktywności kokcydiostatycznej na kurczakach zainfekowanych *Eimeria tennella*, prawdopodobnie z powodu niskiej lipofilowości i tym samym obniżonej rozpuszczalności w błonach biologicznych [48].

Z kolei w 2015 roku została otrzymana seria pięciu biokoniugatów salinomycyny z estrami metylowymi *L*-aminokwasów. Jednocześnie po raz pierwszy wykazano aktywność przeciwnowotworową tego typu hybryd. Wydajna procedura syntetyczna opierała się na reakcji pomiędzy salinomycyną i odpowiednim estrem metylowym *L*-aminokwasu w obecności DCC i HOBt (Schemat 3, związki 21–25, wydajność 51–75%) [49].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

<i>glicyna</i>	R = H	<i>hybryda 21</i>
<i>seryna</i>	R = CH <sub>2</sub> OH	<i>hybryda 22</i>
<i>fenylalanina</i>	R = CH <sub>2</sub> Ph	<i>hybryda 23</i>
<i>tyrozyna</i>	R = CH <sub>2</sub> PhOH	<i>hybryda 24</i>
<i>histrydina</i>	R = CH <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	<i>hybryda 25</i>

Schemat 3. Synteza biokoniugatów salinomycyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) salinomycyna (1,0 ekw.), DCC (1,2 ekw.), HOBT (0,5 ekw.), ester metylowy aminokwasu (2,5 ekw.), Et<sub>3</sub>N (2,5 ekw., jeżeli aminokwas jest w postaci chlorowodoru), DMF, 0°C przez 1 godz., następnie tp przez kolejne 24 godz. [49]

Scheme 3. Synthesis of salinomycin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) salinomycin (1.0 eq.), DCC (1.2 eq.), HOBT (0.5 eq.), amino acid methyl ester (2.5 eq.), Et<sub>3</sub>N (2.5 eq., if the amino acid methyl ester hydrochloride is used), DMF, 0°C for 1h, then rt for next 24 h [49]

Salinomycyna i jej biokoniugaty zostały zbadane pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej wobec trzech ludzkich linii komórek nowotworowych: lekowrażliwego (LoVo) i lekoopornego (LoVo/DX) gruczolakoraka okrężnicy oraz białaczki mielomonocytovej (MV4-11). Ponadto wyznaczona została toksyczność tych związków względem normalnych mysich embrjonalnych fibroblastów (BAL-B/3T3) (Tab. 2) [49].

Trzy z pięciu otrzymanych biokoniugatów (Schemat 3, związki **21**, **23** i **25**) wykazały wysoką aktywność przeciwproliferacyjną, a aktywność ta była porównywalna z wykazywaną przez dwa powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe – cisplatynę i doksorubicynę. Najbardziej aktywnymi związkami były te, które zawierały alifatyczno-aromatyczne podstawniki, tj. hybrydy **23** i **25** (Schemat 3). Należy w tym miejscu podkreślić, że związek **25** (Schemat 3) jest jedną z najbardziej biologicznie aktywnych pochodnych salinomycyny otrzymanych przez chemiczną modyfikację grupy karboksylowej tego jonoforu. Aktywność przeciwnowotworowa wszystkich hybryd wzrasta przeciwko lekoopornym komórkom LoVo/DX, w tym przypadku aktywność związku **25** (IC<sub>50</sub> = 0,85 μM, Tab. 2) jest kilkakrotnie wyższa od aktywności zaobserwowanej dla obu leków referencyjnych [49]. Dane te są ważne, ponieważ każda komórka nowotworowa podczas długotrwałej monochemioterapii może nabywać oporności na stosowane leki, co powoduje nawrót choroby i złe rokowania dla pacjentów [55].

Z tego powodu dużym wyzwaniem rzuconym współczesnym naukowcom jest poszukiwanie nowych związków charakteryzujących się wysoką skutecznością przeciwproliferacyjną zarówno przeciwko komórkom nowotworowym, które wykazują wrażliwość na stosowane leki, jak i komórkom lekoopornym. Wysoka zdolność aminokwasowych biokoniugatów salinomycyny do przełamania lekooporności badanych komórek nowotworowych została potwierdzona przez niskie wartości współczynników lekooporności (ang. *Resistance Index*, RI) (Tab. 3). Wartość RI

wskazuje, jak bardzo lekooporna nowotworowa linia komórkowa jest podatna na działanie danej substancji w porównaniu z lekowrażliwą linią komórkową; RI w zakresie 0–2 oznacza, że komórki nowotworowe są bardzo wrażliwe na działanie użytego związku [56]. Wartości współczynników RI potwierdziły, że wszystkie biokoniugaty aminokwasowe silnie przełamują lekooporność komórek rakowych (RI w zakresie 0,23–1,00, Tab. 3), znacznie silniej niż chemicznie niezmodyfikowana salinomycyna (RI = 2,11), jak również oba leki referencyjne (RI = 1,41 dla cisplatyny i RI = 36,40 dla doksorubicyny) [49].

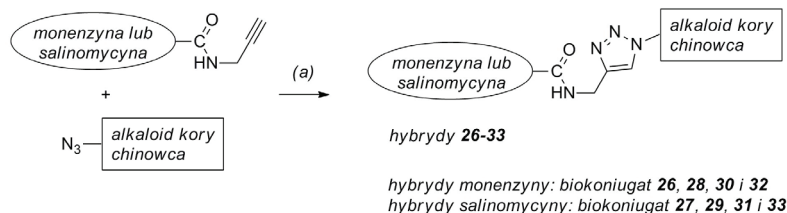
Ponadto wszystkie hybrydy były mniej toksyczne wobec prawidłowych mysich fibroblastów (BALB/3T3) niż cisplatyna i doksorubicyna, co potwierdziły wysokie wartości współczynników  $IC_{50}$  (Tab. 2), ale także współczynników selektywności (ang. *Selectivity Index*, SI) (Tab. 3). Wyznaczone wartości współczynników SI, niezwykle ważnego parametru farmaceutycznego, który ułatwia oszacowanie możliwości przyszłego zastosowania klinicznego badanych substancji [57], jednoznacznie dowiodły, że biokoniugaty salinomycyny z aminokwasami serii L są wysoce specyficznymi i selektywnymi środkami przeciwnowotworowymi (SI > 4,00 w większości przypadków) (Tab. 3) [49].

Salinomycyna transportuje kationy przez błony lipidowe zgodnie z mechanizmem elektroneutralnym [18–20], który nie może być skutecznie realizowany w komórkach nowotworowych. Jak wykazał Otto Warburg [58], komórki rakowe są zakwaszone, a więc grupa karboksylowa antybiotyków jonoforowych w takich warunkach (niskie pH) nie może ulegać deprotonacji. Z tego powodu chemiczna modyfikacja grupy karboksylowej salinomycyny nie powinna wpływać na mechanizm transportu kationów w komórkach nowotworowych, zaś preferowanym rodzajem transportu będzie transport biomimetyczny, który jest skutecznie realizowany przez jonofory z chemicznie zmodyfikowaną grupą karboksylową [18–20]. Fakt ten może wyjaśniać wysoką aktywność przeciwnowotworową biokoniugatów salinomycyny [49].

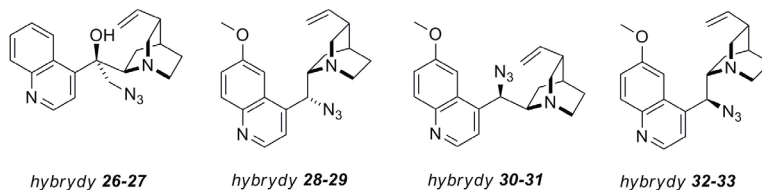
## 2.2. BOKONIUGATY Z ALKALOIDAMI KORY CHINOWCA

Spośród tysięcy produktów naturalnych tylko niewielka ich część wywołała szeroki oddźwięk społeczny czy też ekonomiczny. W tej grupie związków znajdują się alkaloidy kory chinowej, z których najpopularniejsze są chinina oraz chinidyna. Alkaloidy kory drzewa chinowego są unikatową grupą naturalnie występujących związków, które były używane przez wieki jako leki przeciwmalaryczne i przeciwarytmiczne [59]. Udokumentowano również, że chinina i cynchonina są skutecznymi lekami przełamującymi lekooporność komórek nowotworowych pacjentów leczonych przy użyciu etyloprednizolonu, doksorubicyny, paklitakselu lub winblastyny [60]. Co więcej, udowodniono, że biokoniugaty alkaloidów kory chinowej z AZT wykazują bardzo interesujące właściwości przeciwnowotworowe w badaniach *in vitro* [61].

W 2015 roku przedstawiono syntezę serii biokoniuatów monenzyny i salinomycyny z czterema różnymi alkaloidami kory chinowej (Schemat 4). Procedura syntezy oparta była na 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I) pomiędzy amidem propargilowym monenzyny lub salinomycyny i odpowiednim azydem alkaloidu kory drzewa chinowego. Pomimo wielofunkcyjnego charakteru obu antybiotyków jonoforowych reakcje przebiegły bez problemów, czego rezultatem było otrzymanie serii ośmiu hybryd z dobrą wydajnością (Schemat 4, związki **26–33**, wydajność 50–82%) [50].



Bloki budulcowe (azydek alkaloidu kory chinowca):



Schemat 4. Synteza biokoniuatów monenzyny i salinomycyny z alkaloidami kory chinowej. Reagenty i warunki: (a) amid propargilowy monenzyny lub salinomycyny (1,0 ekw.), azydek alkaloidu (1,0 ekw.),  $\text{CuSO}_4$  aq. (0,5 ekw., 1,0 M), askorbinian sodu (1,0 ekw.), mieszanina  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1), tp, 24–48 godz. [50]

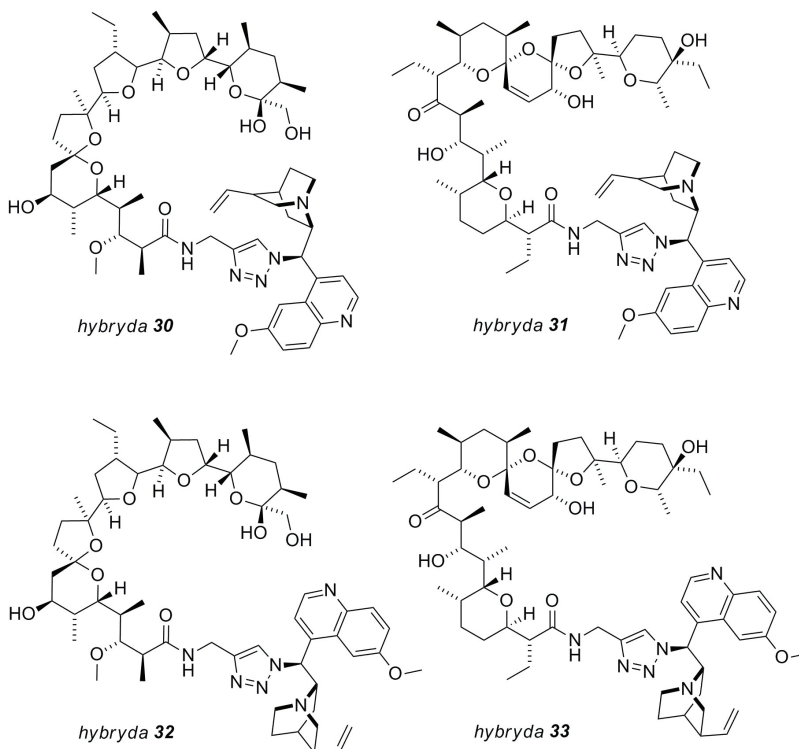
Scheme 4. Synthesis of monensin and salinomycin bioconjugates with Cinchona alkaloids. Reagents and conditions: (a) monensin or salinomycin *N*-propargyl amide (1.0 eq.), Cinchona alkaloid azide (1.0 eq.), aq.  $\text{CuSO}_4$  (0.5 eq., 1.0 M), sodium ascorbate (1.0 eq.),  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  mixture (1:1), rt, 24–48 h [50]

Wszystkie zsyntetyzowane hybrydy poddano badaniom aktywności przeciwproliferacyjnej na trzech ludzkich liniach komórek nowotworowych: lekowrażliwego i lekoopornego gruczolakoraka okrężnicy (odpowiednio LoVo i LoVo/DX) oraz nowotworu wątroby (HepG2). Ich toksyczność została sprawdzona wobec normalnych mysich embrjonalnych fibroblastów (BALB/3T3) (Tab. 2) [50].

Najbardziej aktywnym związkiem w tych badaniach okazała się niezmodyfikowana chemicznie monenzyna. Co należy w tym miejscu podkreślić, aktywność monenzyny była około dziesięciokrotnie wyższa niż aktywność salinomycyny. Spośród wszystkich zsyntetyzowanych związków biokoniuaty monenzyny i salinomycyny z 9-epichinidyną (Rys. 3, związki **30–31**) oraz 9-epichininą (Rys. 3, związki **32–33**) wykazały działanie przeciwnowotworowe w zakresie stężeń mikromolowych ( $\text{IC}_{50} < 3,00 \mu\text{M}$ , Tab. 2), a jednocześnie hybrydy te były mniej toksyczne



wobec prawidłowych komórek od dwóch leków referencyjnych użytych w testach. Co ciekawe, pięć z ośmiu otrzymanych biokoniugatów wykazało wysoką aktywność wobec lekoopornej linii komórkowej LoVo/DX, co zostało potwierdzone przez wartości współczynników RI niższych niż 1,00 (Tab. 3). Jak dotąd dokładny mechanizm biologicznego działania tych wielofunkcyjnych cząsteczek pozostaje niejasny [50].



Rysunek 3. Struktura najbardziej aktywnych przeciwnowotworowo biokoniugatów monenzyny oraz salinomycyny z 9-epichinidyną i 9-epichiną [50]

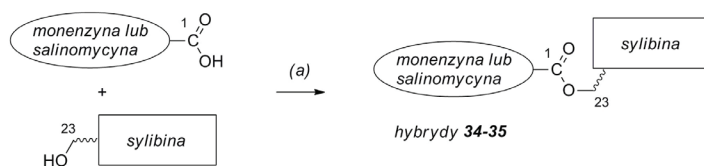
Figure 3. The structure of the most anti-cancer active bioconjugates of monensin and salinomycin with 9-epiquinidine and 9-epiquinine [50]

### 2.3. BOKONIUGATY Z FLAWONOIDAMI

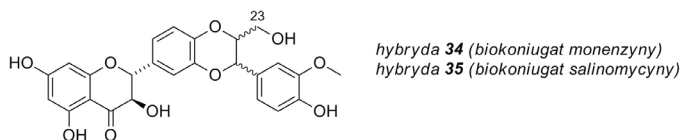
W 2015 roku zaproponowano również procedurę syntezy biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z sylibiną (Schemat 5) [51]. Sylibina jest głównym składnikiem (około 50%) silymaryny – wykorzystywanego w leczeniu kompleksu flavonolignanów pochodzenia roślinnego. Sylibina izolowana z nasion ostropestu plamistego występuje w naturze jako mieszanina dwóch diastereoizomerów (sylibina A i B), które tworzą kompleks zwany sylibiną [62]. Udowodniono, że sylibina wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, hepatoprotective,

przeciwzapalne, zapobiega marskości i zwłóknieniu wątroby, nerek i serca, chroni przed wolnymi rodnikami [63, 64]. Wykazano ponadto, że biokoniugaty sylibiny z mono- i disacharydami, a także kwasami tłuszczowymi charakteryzują się właściwościami przeciwutleniającymi i neuroochronnymi, a przy tym mogą być skutecznymi środkami przeciwko wirusowi grypy [65, 66].

Oba biokoniugaty otrzymano w reakcji typu one-pot pomiędzy monenzyną lub salinomycyną a sylibiną w obecności DCC, PPy (4-pirolidynopirydyny) i katalitycznej ilości kwasu *p*-toluenosulfonowego będącego aktywatorem DCC. Zaprezentowana łagodna procedura estryfikacji doprowadziła do otrzymania diastereoizomerycznych hybryd estrowych z umiarkowaną wydajnością (Schemat 5, związki 34–35, wydajność 35–43%) [51].



Bloki budulcowe (sylibina):



Schemat 5. Synteza biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z sylibiną. Reagenty i warunki: (a) monenzyna lub salinomycyna (1,0 ekw.), sylibina (2,5 ekw.), DCC (1,5 ekw.), PPy (0,5 ekw.), kwas *p*-toluenosulfonowy (0,23 ekw.), THF, od 0°C do tp, 24 godz. [51]

Scheme 5. Synthesis of monensin and salinomycin bioconjugates with silybin. Reagents and conditions: (a) monensin or salinomycin (1.0 eq.), silybin (2.5 eq.), DCC (1.5 eq.), PPy (0.5 eq.), *p*-toluenesulfonic acid (0.23 eq.), THF, 0°C to rt, 24 h [51]

Badania aktywności przeciwproliferacyjnej wykazały jednoznacznie, że oba biokoniugaty były aktywne w stężeniach mikromolowych ( $IC_{50}$  od 0,57 do 14,01  $\mu$ M, Tab. 2) wobec testowanych komórek nowotworowych, a jednocześnie wykazały niską toksyczność wobec prawidłowych mysich fibroblastów BALB/3T3 ( $IC_{50} > 30,00 \mu$ M i wysokie wartości SI, Tab. 2 i Tab. 3), przy czym bardziej aktywna była hybryda sylibiny z monenzyną. Ponadto, oba biokoniugaty były bardziej aktywne niż cisplatyna wobec linii komórkowych LoVo i LoVo/DX (RI około 1,00) i stosunkowo mniej aktywne niż doksorubicyna wobec komórek nowotworowych HepG2 (Tab. 2 i Tab. 3) [51].

Przyjmuje się, że wiązania estrowe obecne w strukturze obu hybryd powinny być stabilne w układzie krążenia, ale po wnikięciu do wnętrza komórek rakowych owe wiązania powinny być łatwo hydrolizowane przez obecne tam karboksyesterazy – enzymy standardowo zaangażowane w aktywację wielu proleków estrowych [67].

Proces hydrolizy w komórkach i tkankach powinien zatem skutkować „odtworzeniem” dwóch aktywnych biokomponentów, tj. wysoce skutecznej przeciwnowotworowo monenzyny lub salinomycyny oraz sylibiny o udowodnionych właściwościach chemochronnych i przeciwutleniających [51].

#### 2.4. BIONIUGATY Z NUKLEOZYDAMI

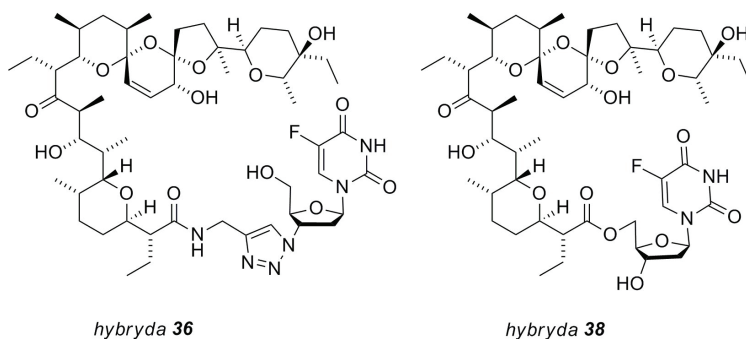
Ostatnią grupę bioniugatów stanowią hybrydy antybiotyków jonoforowych z nukleozydami. W 2015 roku zaproponowano syntezę dwóch różnych bioniugatów salinomycyny z 5-fluoro-2'-deoksyurydyną (floksurydyną) [52], która jest znaną pochodną 5-fluorouracylu, zaś w 2017 roku dwóch innych hybryd salinomycyny z AZT (Schemat 6) [53].

Floksurydyna była stosowana w leczeniu różnych ludzkich guzów, ale jej działanie chemioterapeutyczne jest ograniczone z powodu niskiej biodostępności, skuteczności wychwytu komórkowego oraz wysokiej toksyczności [68]. Z drugiej strony zaobserwowano synergiczne działanie przeciwnowotworowe pomiędzy salinomycyną i floksurydyną wobec komórek nowotworu wątroby [69]. Z tego powodu interesującym kierunkiem badań było sprawdzenie, w jaki sposób proces bioniugacji z salinomycyną wpłynie na właściwości biologiczne floksurydyny. Z kolei głównym ograniczeniem terapeutycznym pochodnych AZT jest ich toksyczność, która obejmuje supresję szpiku kostnego, nieprawidłowości wątrobowe, a także miopatię [70]. Jedną z obiecujących strategii „stłumienia” wspomnianych toksycznych efektów ubocznych może być bioniugacja AZT z wysoce selektywnymi związkami, takimi jak salinomycyna.

Bioniugaty salinomycyny z nukleozydami były otrzymane za pomocą dwóch różnych procedur opisanych już wcześniej (podrozdział 2.2 i 2.3). Pierwsza metoda opierała się na 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I), gdzie substratami były: amid propargilowy salinomycyny i odpowiedni komponent azydkowy (Schemat 6, związek 36–37, wydajność 55–61%), przy czym amid propargilowy salinomycyny został zsyntezowany w reakcji pomiędzy salinomycyną i propargiloaminą w obecności DCC i HOBt (Schemat 6). Druga metoda opierała się na łagodnej reakcji estryfikacji salinomycyny z pierwszorzędową grupą hydroksylową floksurydyny bądź AZT w obecności DCC, PPy i kwasu *p*-toluenosulfonowego, która doprowadziła do powstania oczekiwanych produktów reakcji z dobrą wydajnością (Schemat 6, związki 38–39, wydajność 67–73%) [52, 53].



rowych, w tym dwóch opornych na cytostatyki. Badania te przeprowadzono wobec komórek ludzkiej białaczki promielocytowej wrażliwej (HL-60) i odpornej na działanie leków (HL-60/vinc), lekowrażliwego (LoVo) i lekoopornego gruczolakoraka okrężnicy (LoVo/DX), jak również trzech innych linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy o różnej charakterystyce, tj. HT-29, LS-180 i SW707. Dodatkowo obydwie hybrydy z AZT przetestowano na ich aktywność wobec komórek ludzkiej białaczki mielomonocytowej (MV4-11). Biokoniugaty estrowe (Schemat 6, związki 38–39) wykazały wielokrotnie wyższą aktywność przeciwo proliferacyjną w porównaniu z hybrydami 36–37 (Schemat 6) (Tab. 2). Należy podkreślić, że związek 38 (Rys. 4) wykazał znacznie lepsze właściwości biologiczne niż jego prekursor – floksurydyna, jak również dwa referencyjne leki chemioterapeutyczne – cisplatyna i doksorubicyna (Tab. 2). Jednocześnie aktywność ta była porównywalna do wykazywanej przez niezmodyfikowaną salinomycynę, przy czym warto zauważyć, że wartość współczynnika SI była wyższa dla związku 38 (Rys. 4) ( $SI = 22,11-34,71$ ) niż dla jonoforu wyjściowego ( $SI = 12,28-25,92$ ). Jak pokazano w Tab. 3, związek 38 (Rys. 4) silnie przełamywał oporność lekową linii komórkowej LoVo/DX ( $RI = 0,64$ ) [52, 53].



Rysunek 4. Struktura biokoniugatów salinomycyny z floksurydyną [52]

Figure 4. The structure of salinomycin bioconjugates with floxuridine [52]

Przeprowadzone analizy HPLC wyraźnie wykazały, że wszystkie biokoniugaty były stabilne w 0,1 M buforze fosforowym (pH 7,2). Jednak olbrzymie różnice w aktywności biologicznej między hybrydami estrowymi i hybrydami 36–37 sugerowały występowanie różnic w stabilności enzymatycznej pomiędzy wiązaniami estrowymi i amidowymi występującymi w tych strukturach. Ponadto w strukturze biokoniugatów 36–37 obecny jest stabilny enzymatycznie układ triazolowy. Jak wspomniano wcześniej, po wnikięciu do komórek nowotworowych wiązanie estrowe w związkach 38–39 (Schemat 6) powinno być stosunkowo łatwo zrywane przez karboksylesterazy [67]. Z drugiej strony wiązanie amidowe, a także układ triazolowy obecne w strukturach 36–37 (Schemat 6) są bardziej stabilne chemicznie i enzymatycznie, przez co najprawdopodobniej nie może być skutecznie hydrolizowane przez amidazy komórkowe z utworzeniem biologicznie aktywnej formy salinomycyny [72]. Ponadto pierścienie triazolowe są typowymi pasywnymi łącznikami

[67, 72], które nie są w stanie ulegać hydrolizie w warunkach fizjologicznych ani pod wpływem specyficznych enzymów komórkowych [52, 53].

Innym wyjaśnieniem dużych różnic we właściwościach biologicznych pomiędzy biokoniugatami estrowymi a hybrydami **36–37** jest fakt, że produktami hydrolizy związków **36–37** (Schemat 6) mogą być pochodne tetrazolowe odpowiednio 3'-deoksyfloksurydiny bądź AZT, które prawdopodobnie nie wykazują wysokiej aktywności biologicznej. Jednocześnie biokoniugaty **38–39** (Schemat 6) wykazały wyższą aktywność, ponieważ te hybrydy są rzeczywistymi prolekami dwóch skoniugowanych i biologicznie czynnych substancji, tj. salinomycyny i floksurydiny lub AZT [52, 53].

Tabela 2.

Aktywność przeciwproliferacyjna biokonjugatów monenzyny i salinomycyny w porównaniu z aktywnością wyjściowych antybiotyków jonoforowych, a także dwóch leków referencyjnych – cisplatiną i doksorubicyną. Wyniki przedstawiono w postaci wartości współczynników  $IC_{50}$  wyrażonych w  $\mu M$ . Ciągłe linie oddzielają poszczególne serie hybryd [49–53]

Table 2.

Anti-proliferative activity of monensin and salinomycin bioconjugates compared to that of the starting ionophore antibiotics as well as two reference drugs – cisplatin and doxorubicin. Results are given as  $IC_{50}$  in  $\mu M$ . Continuous lines separate the individual series of hybrids [49–53]

Związek	Komórki nowotworowe										Komórki normalne
	HL-60	HL-60/vinc	MV4-11	HepG2	LoVo	LoVo/DX	HT-29	LS-180	SW707	BALB/3T3	
monenzyna	nie badano	nie badano	nie badano	0,76 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,03	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	6,54 ± 1,09
salinomycyna	0,29 ± 0,05	2,09 ± 0,39	0,33 ± 0,11	12,44 ± 6,34	0,36 ± 0,08	0,76 ± 0,25	1,03 ± 0,27	0,61 ± 0,27	1,73 ± 0,25	1,73 ± 0,25	9,33 ± 3,08
21	nie badano	nie badano	3,65 ± 0,83	nie badano	5,29 ± 0,83	3,93 ± 0,15	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	42,49 ± 3,31
22	nie badano	nie badano	5,81 ± 2,20	nie badano	17,65 ± 10,63	7,77 ± 2,57	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	40,09 ± 1,80
23	nie badano	nie badano	2,89 ± 0,50	nie badano	3,49 ± 0,57	3,49 ± 0,23	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	17,01 ± 8,08
24	nie badano	nie badano	3,55 ± 0,63	nie badano	14,72 ± 5,59	7,12 ± 1,24	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	43,37 ± 8,49
25	nie badano	nie badano	0,80 ± 0,16	nie badano	3,67 ± 0,49	0,85 ± 0,14	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	37,01 ± 1,01
26	nie badano	nie badano	nie badano	5,25 ± 1,17	6,75 ± 2,19	4,43 ± 1,98	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	33,60 ± 1,28
27	nie badano	nie badano	nie badano	19,57 ± 5,64	11,61 ± 3,92	16,72 ± 3,00	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	34,04 ± 1,48
28	nie badano	nie badano	nie badano	4,08 ± 0,90	8,81 ± 2,04	4,76 ± 2,47	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	32,76 ± 1,19
29	nie badano	nie badano	nie badano	6,89 ± 0,75	11,96 ± 2,37	2,79 ± 1,12	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	18,69 ± 2,60
30	nie badano	nie badano	nie badano	2,61 ± 1,21	2,56 ± 0,74	2,86 ± 0,36	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	7,15 ± 0,76
31	nie badano	nie badano	nie badano	2,59 ± 0,63	2,51 ± 0,16	2,05 ± 0,57	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	2,81 ± 0,68
32	nie badano	nie badano	nie badano	2,34 ± 1,03	2,66 ± 0,32	2,03 ± 0,29	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	4,58 ± 1,04
33	nie badano	nie badano	nie badano	2,66 ± 0,48	2,18 ± 0,18	2,28 ± 0,44	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	3,09 ± 0,37

aminoalkwasami  
z naturalnymi

alkaloidami kory chinowca  
biokonjugaty z



Związek	Komórki nowotworowe										Komórki normalne	
	HL-60	HL-60/vinc	MV4-11	HepG2	LoVo	LoVo/DX	HT-29	LS-180	SW707	BALB/3T3		
34	nie badano	nie badano	nie badano	4,43 ± 0,83	0,59 ± 0,18	0,57 ± 0,04	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	31,58 ± 5,65	
35	nie badano	nie badano	nie badano	14,01 ± 5,39	3,63 ± 0,27	3,93 ± 0,04	nie badano	nie badano	nie badano	nie badano	30,10 ± 5,00	
36	28,65 ± 2,51	ba <sup>a)</sup>	nie badano	nie badano	41,25 ± 10,02	70,42 ± 12,29	30,06 ± 0,11	32,81 ± 4,05	34,96 ± 9,40	29,60 ± 4,20		
37	14,88 ± 4,94	ba <sup>a)</sup>	ba <sup>a)</sup>	nie badano	31,73 ± 8,90	ba <sup>a)</sup>	30,61 ± 1,21	29,41 ± 1,00	30,44 ± 0,36	33,15 ± 4,64		
38	0,37 ± 0,11	2,82 ± 1,25	nie badano	nie badano	1,46 ± 0,57	0,93 ± 0,19	2,02 ± 0,41	2,25 ± 1,11	1,99 ± 0,23	32,28 ± 6,41		
39	0,46 ± 0,15	3,12 ± 1,19	2,38 ± 0,04	nie badano	3,61 ± 0,17	2,69 ± 0,18	1,60 ± 0,45	1,77 ± 0,21	1,93 ± 0,94	16,12 ± 6,61		
<b>cisplatyna</b>	1,00 ± 0,23	6,87 ± 1,63	2,33 ± 0,60	8,93 ± 1,37	3,70 ± 1,20	5,20 ± 1,93	10,70 ± 1,27	6,30 ± 1,33	6,47 ± 1,87	5,30 ± 2,93		
<b>doksorubicyna</b>	0,04 ± 0,04	0,88 ± 0,26	0,05 ± 0,02	0,77 ± 0,22	0,15 ± 0,06	5,46 ± 1,56	0,89 ± 0,09	0,09 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,07		

Ludzka białaczka promielocytowa wrażliwa (HL-60) i oporna na działanie leków (HL-60/vinc), ludzka białaczka bifenotypowa (MV4-11), ludzki nowotwór wątroby (HepG2), ludzki leukowrażliwy (LoVo) oraz lekooporny (LoVo/DX) nowotwór okrężnicy, ludzki nowotwór okrężnicy o różnej charakterystyce (HT-29, LS-180, SW707), prawidłowe myśie fibroblasty (BALB/3T3), <sup>a)</sup> ba – brak aktywności.

Human promyelocytic leukemia (HL-60) and its drug-resistant subline (HL-60/vinc), human biphenotypic myelomonocytic leukemia (MV4-11), human liver cancer (HepG2), human colon adenocarcinoma (LoVo) and its drug-resistant subline (LoVo/DX), human colorectal adenocarcinoma with different characteristics (HT-29, LS-180, SW707), normal murine embryonic fibroblasts (BALB/3T3), <sup>a)</sup> ba – no activity.

Tabela 3. Wyznaczone współczynniki lekooporności (RI) i selektywności (SI) biokoniugatów monenzyny i salinomycyny dla wybranych nowotworowych linii komórkowych. Ciągłe linie oddzielają poszczególne serie hybryd [49-53]

Table 3. The calculated values of the indexes of resistance (RI) and selectivity (SI) of monensin and salinomycin bioconjugates for selected cancer cell lines. Continuous lines separate the individual series of hybrids [49-53]

Związek	MV4-11	HepG2	LoVo	LoVo/DX	
	SI	SI	SI	SI	RI
<b>monenzyna</b>	brak danych	8,61	109,00	93,43	1,17
<b>salinomycyna</b>	28,27	0,75	25,92	12,28	2,11
21	11,64	brak danych	8,03	10,81	0,74
22	6,90	brak danych	2,27	5,16	0,44
23	5,89	brak danych	4,87	4,87	1,00
24	12,22	brak danych	2,95	6,09	0,48
25	46,26	brak danych	10,08	43,54	0,23
26	brak danych	6,40	4,98	7,58	0,66
27	brak danych	1,74	2,93	2,04	1,44
28	brak danych	8,03	3,72	6,88	0,54
29	brak danych	2,71	1,56	6,70	0,23
30	brak danych	2,74	2,79	2,50	1,11
31	brak danych	1,08	1,12	1,37	0,82
32	brak danych	1,96	1,72	2,26	0,76
33	brak danych	1,16	1,42	1,36	1,05
34	brak danych	7,13	53,53	55,40	0,97
35	brak danych	2,15	8,29	7,66	1,08
36	brak danych	brak danych	0,72	0,42	1,71
37	---	brak danych	1,04	---	---
38	brak danych	brak danych	22,11	34,71	0,64
39	6,77	brak danych	4,46	5,99	0,75
<b>cisplatyna</b>	2,27	0,59	1,43	1,02	1,41
<b>doksorubicyna</b>	3,60	0,23	1,20	0,03	36,40

Indeks lekooporności RI oznacza, jak bardzo wrażliwa na działanie danego związku jest lekooporna nowotworowa linia komórkowa (LoVo/DX) w porównaniu do lekowrażliwej sublinii (LoVo). RI w zakresie 0–2 oznacza wysoką wrażliwość, w zakresie 2–10 umiarkowaną wrażliwość, natomiast RI powyżej 10 oznacza wysoką oporność komórek na działanie badanego związku. Indeks selektywności SI wyznaczono według wzoru:  $SI = IC_{50}$  wyznaczone dla prawidłowych komórek organizmu (BALB/3T3) /  $IC_{50}$  wyznaczone dla odpowiednich komórek nowotworowych. SI powyżej 1,00 oznacza wyższą selektywność działania badanego związku wobec komórek nowotworowych niż komórek prawidłowych.

The RI index indicates how many times a given drug-resistant subline (LoVo/DX) is chemoresistant relative to its parental cell line (LoVo). When RI is 0–2 the cells are sensitive to tested compounds, RI from the range 2–10 means that the cells show moderate sensitivity to a drug, RI above indicates strong drug-resistance. The SI index was calculated for each compound from the formula:  $SI = IC_{50}$  for normal cell line (BALB/3T3) /  $IC$  for respective cancerous cell line. A beneficial  $SI > 1.00$  indicates a drug with efficacy towards cancer cells greater than toxicity against normal cells.

## UWAGI KOŃCOWE

Strategia syntezy biokoniugatów, w ramach której antybiotyki jonoforowe będą kowalencyjnie związane z innymi biologicznie aktywnymi związkami, jest niezwykle atrakcyjnym kierunkiem badań. Jej rezultatem jest tworzenie hybryd o najróżniejszych strukturach chemicznych. Wszystkie opisane w tym artykule biokoniugaty można otrzymać ze stosunkowo dobrą wydajnością przy użyciu standardowych procedur syntetycznych, takich jak: reakcja amidowania lub estryfikacji w łagodnych warunkach czy też reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowana jonami miedzi(I).

Wyniki badań aktywności biologicznej otrzymanych hybryd wyraźnie wskazują, że właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe biokoniugatów monenzyny oraz salinomycyny ściśle zależą od budowy uzyskanych hybryd, na przykład od stabilności chemicznej i enzymatycznej wiązań tworzących się pomiędzy dwoma biokomponentami.

Racjonalne projektowanie biokoniugatów antybiotyków jonoforowych zaowocować może otrzymaniem wysoce aktywnych biologicznie hybryd, które mogą być niezwykle skuteczne w walce z infekcjami bakteryjnymi oraz nowotworami. Większość tego typu związków selektywnie przełamuje lekooporność komórek nowotworowych, gdy zastosować je w mikromolowych stężeniach, co pokazuje ich wysoki potencjał terapeutyczny. Ponadto, hybrydy antybiotyków jonoforowych hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich, w tym tych opornych na działanie innych antybiotyków, co jednoznacznie dowodzi, że tego typu związki mogą być stosowane w najbliższej przyszłości nie tylko w medycynie weterynaryjnej, ale również jako środki chemioterapeutyczne i przeciwbakteryjne w leczeniu ludzi.

Naszym zdaniem, strategia tworzenia funkcjonalnych hybryd w procesie biokoniugacji będzie odgrywać w najbliższej przyszłości coraz większą rolę. Racjonalne projektowanie i synteza różnorodnych biokoniugatów, w tym wybór optymalnych struktur wyjściowych (biokomponentów), może prowadzić między innymi do skutecznej ochrony labilnych produktów przed enzymatyczną degradacją, do wydłużenia czasu ich przebywania w organizmie czy też do znalezienia wysoce specyficznych środków diagnostycznych i terapeutycznych. Niezwykle obiecujące wyniki opisanych w tym artykule badań sprawiają, że nowe metody biokoniugacji będą z pewnością dalej intensywnie realizowane w naszej grupie badawczej.

## PODZIĘKOWANIE

Michał Antoszczak pragnie podziękować Narodowemu Centrum Nauki (NCN) za wsparcie finansowe udzielone w ramach grantu Sonata 12 o numerze 2016/23/D/ST5/00242.

Nasze badania koniugatów antybiotyków jonoforowych realizowane były w ramach projektu pt. „Synteza, badania strukturalne, aktywność przeciwbakteryjna oraz przeciwnowotworowa biokoniugatów antybiotyków jonoforowych” (projekt Iuventus Plus o numerze IP2012013272 finansowany przez MNiSW).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] World Health Organization – Cancer, [dostęp: 2018-01-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.who.int/cancer/en/>
- [2] V.T. DeVita Jr., E. Chu, *Cancer Res.*, 2008, **68**, 8643.
- [3] B.A. Chabner, T.G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 65.
- [4] The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – raporty, [dostęp: 2018-01-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.cddep.org>
- [5] B. Das, G. Satyalakshmi, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2012, **9**, 169.
- [6] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 3012.
- [7] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 1022.
- [8] A. Agtarap, J.W. Chamberlin, M. Pinkerton, L. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 5737.
- [9] T. Fukuyama, K. Akasaka, D.S. Karanewsky, C.L.J. Wang, G. Schmid, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 262.
- [10] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirsoe, *J. Antibiot.*, 1974, **27**, 814.
- [11] Y. Kishi, S. Hatakeyama, M.D. Lewis, *Total synthesis of polyether antibiotics narasin and salinomycin*, [w:] *Frontiers of Chemistry*, [w:] Plenary and Keynote Lectures Presented at the 28th IUPAC Congress, K.J. Laidler (Red.), Oxford 1982, str. 287.
- [12] P.J. Kociński, R.C.D. Brown, A. Pommier, M. Procter, B. Schmidt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1998, **1**, 9.
- [13] M.E. Yurkovich, P.A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborsky, K. Kamiya, P.F. Leadley, *Chem. Bio. Chem.*, 2012, **13**, 66.
- [14] M. Suzuki, R. Ueoka, K. Takada, S. Okada, S. Ohtsuka, Y. Ise, S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 1192.
- [15] D.H. Berg, R.L. Hamill, *J. Antibiot.*, 1978, **31**, 1.
- [16] J. Rutkowski, B. Brzezinski, *BioMed. Res. Int.*, 2013, **2013**, 31
- [17] M. Antoszczak, J. Rutkowski, A. Huczyński, *Structure and biological activity of polyether ionophores and their semi-synthetic derivatives*, [w:] *Bioactive Natural Products. Chemistry and Biology*, G. Brahmachari (Red.), 1st Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2015, s. 107.
- [18] Y.N. Antonenko, T.I. Rokitskaya, A. Huczyński, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2015, **1848**, 995.
- [19] A. Huczyński, J. Janczak, D. Łowicki, B. Brzezinski, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2012, **1818**, 2108.
- [20] A. Huczyński, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 7002.
- [21] S. Zhou, F. Wang, E.T. Wong, E. Fonkem, T.-C. Hsieh, J.M. Wu, E. Wu, *Curr. Med. Chem.*, 2013, **20**, 4095.

- [22] D.A. Kevin II, D.A.F. Meujo, M.T. Hamann, *Exp. Opin. Drug Disc.*, 2009, **4**, 109.
- [23] J.W. Westley, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1977, **22**, 177.
- [24] J. Guyot, G. Jeminet, M. Prudhomme, M. Sancelme, R. Meiniel, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1993, **16**, 192.
- [25] M. Mimouni, F.Z. Khardli, I. Warad, M. Ahmad, M.S. Mubarak, S. Sultana, T.B. Hadda, J. Mater. Environ. Sci., 2014, **5**, 207.
- [26] G.K. Podila, E. Rosen, M.J.D. San Francisco, P.E. Kolattukudy, *Phytopathology*, 1995, **85**, 238.
- [27] D.C. Johnson, P.G. Spear, *J. Virol.*, 1982, **43**, 1102.
- [28] R. Schlegel, M. Willingham, I. Pastan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **102**, 992.
- [29] M. Marsh, J. Wellsted, H. Kerm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982, **79**, 5297.
- [30] M. Nakamura, S. Kunitomo, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Sakau, S. Inoue, T. Ohno, T. Takeuchi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 492.
- [31] C. Gumila, M.L. Ancelin, G. Jeminet, A.M. Delort, G. Miquel, H.J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, **40**, 602.
- [32] J. Adovelande, J. Schrevel, *Life Sci.*, 1996, **59**, 309.
- [33] C.M. Liu, T.E. Hermann, A. Downey, B.T. Prosser, E. Schildknecht, H.J. Palleroni, J.W. Westley, P.A. Miller, *J. Antibiot*, 1983, **36**, 343.
- [34] K. Ketola, P. Vainio, V. Fey, O. Kallioniemi, K. Iljin, *Mol. Cancer Ther.*, 2010, **9**, 3175.
- [35] W.H. Park, E.S. Kim, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Int. J. Oncol.*, 2003, **23**, 197.
- [36] W.H. Park, E.S. Kim, C.W. Jung, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Int. J. Oncol.*, 2003, **22**, 377.
- [37] W.H. Park, J.G. Seol, E.S. Kim, W.K. Kang, Y.H. Im, C.W. Jung, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Br. J. Haematol.*, 2002, **119**, 400.
- [38] M.J. Yoon, Y.J. Kang, I.Y. Kim, E.H. Kim, J.A. Lee, J.H. Lim, T.K. Kwon, K.S. Choi, *Carcinogenesis*, 2013, **34**, 1918.
- [39] M.S. Shaik, A. Chatterjee, M. Singh, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, **56**, 899.
- [40] M. Singh, A.J. Ferdous, N. Kanikkannan, G. Faulkner, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2001, **52**, 13.
- [41] L.V. Nguyen, R. Vanner, P. Dirks, C.J. Eaves, *Nat. Rev. Cancer*, 2012, **12**, 133.
- [42] P.B. Gupta, T.T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R.A. Weinberg, E.S. Lander, *Cell*, 2009, **138**, 645.
- [43] M. Antoszczak, A. Huczyński, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2015, **15**, 575.
- [44] C. Naujokat, R. Steinhart, R. J. Biomed. Biotechnol., 2012, **2012**, 950968.
- [45] J.F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 958.
- [46] G.R. Zimmermann, J. Lehra, C.T. Keith, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 34.
- [47] J. Sakakibara, A. Nakamura, S.-I. Nagai, T. Ueda, T. Ishida, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36**, 4776.
- [48] A. Nakamura, S.-I. Nagai, T. Ueda, N. Murakami, J. Sakakibara, H. Shibuya, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 1726.
- [49] M. Antoszczak, M. Sobusiak, E. Maj, J. Wietrzyk, A. Huczyński, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 3511.
- [50] I. Skiera, M. Antoszczak, J. Trynda, J. Wietrzyk, P. Boratyński, K. Kacprzak, A. Huczyński, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **86**, 911.
- [51] M. Antoszczak, G. Klejborowska, M. Kruszyk, E. Maj, J. Wietrzyk, A. Huczyński, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **86**, 1378.
- [52] A. Huczyński, M. Antoszczak, N. Kleczewska, D. Baraniak, E. Maj, J. Stefańska, J. Wietrzyk, J. Janczak, L. Celewicz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **93**, 33.
- [53] M. Antoszczak, E. Maj, N. Kleczewska, J. Wietrzyk, L. Celewicz, A. Huczyński, *Med. Chem.*, 2017, **13**, 127.
- [54] B.S. Vig, K.M. Huttunen, K. Laine, J. Rautio, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1370.
- [55] Y. Zhou, C. Liang, F. Xue, W. Chen, X. Zhi, X. Feng, X. Bai, T. Liang, *T Oncotarget*, 2015, **6**, 10350.

- [56] W.G. Harker, D.L. Slade, W.S. Dalton, P.S. Meltzer, J.M. Trent, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 4542.
- [57] R.B. Badisa, S.F. Darling-Reed, P. Joseph, J.S. Cooperwood, L.M. Latinwo, C.B. Goldman, *Anticancer Res.*, 2009, **29**, 2993.
- [58] O. Warburg, *Science*, 1956, **123**, 309.
- [59] K. Kacprzak, *Chemistry and biology of Cinchona alkaloids*, [w:] *Handbook of Natural Products – Phytochemistry, Botany, Metabolism*, K.G. Ramawat, J.M. Merillon (Red.), Heidelberg: Springer Berlin 2013, s. 605.
- [60] E. Solary, L. Mannone, D. Moreau, D. Caillot, R.O. Casasnovas, H. Guy, M. Grandjean, J.E. Wolf, F. André, P. Fenaux, P. Canal, B. Chauffert, A. Wotawa, M. Bayssas, P. Genne, *Leukemia*, 2000, **14**, 2085.
- [61] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 723.
- [62] D.Y. Lee, Y. Liu, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 1171.
- [63] G. Serviddio, F. Bellanti, E. Stanca, P. Lunetti, M. Blonda, R. Tamborra, L. Siculella, G. Vendemiale, L. Capobianco, A.M. Giudetti, *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, **73**, 117.
- [64] R. Gazaák, D. Walterová, V. Křen, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 315.
- [65] A. Zarelli, V. Romanucci, C. Tuccillo, A. Federico, C. Loguercio, R. Gravante, G. Di Fabio, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 5147.
- [66] R. Gazák, K. Purchartová, P. Marhol, L. Živná, P. Sedmera, K. Valentová, N. Kato, H. Matsumura, K. Kaihatsu, V. Křen, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1059.
- [67] M. Rooseboom, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, *Pharmacol. Rev.*, 2004, **56**, 53.
- [68] D.G. Power, N.E. Kemeny, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**, 1015.
- [69] F. Wang, W. Dai, Y. Wang, M. Shen, K. Chen, P. Cheng, Y. Zhang, C. Wang, J. Li, Y. Zheng, J. Lu, J. Yang, R. Zhu, H. Zhang, Y. Zhou, L. Xu, C. Guo, *PLoS One*, 2014, **9**, e97414.
- [70] R. Yarchoan, H. Mitsuya, C.E. Myers, S.N. Broder, *Eng. J. Med.*, 1989, **232**, 726.
- [71] C. Carbon, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2000, **6**, 17.
- [72] A.L. Simplicio, J.M. Clancy, J.F. Gilmer, *Molecules*, 2008, **13**, 519.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 lutego 2018