



Znanstveni projekt “Sinteza i citostatska ispitivanja biblioteke novih dušikovih heterocikla”



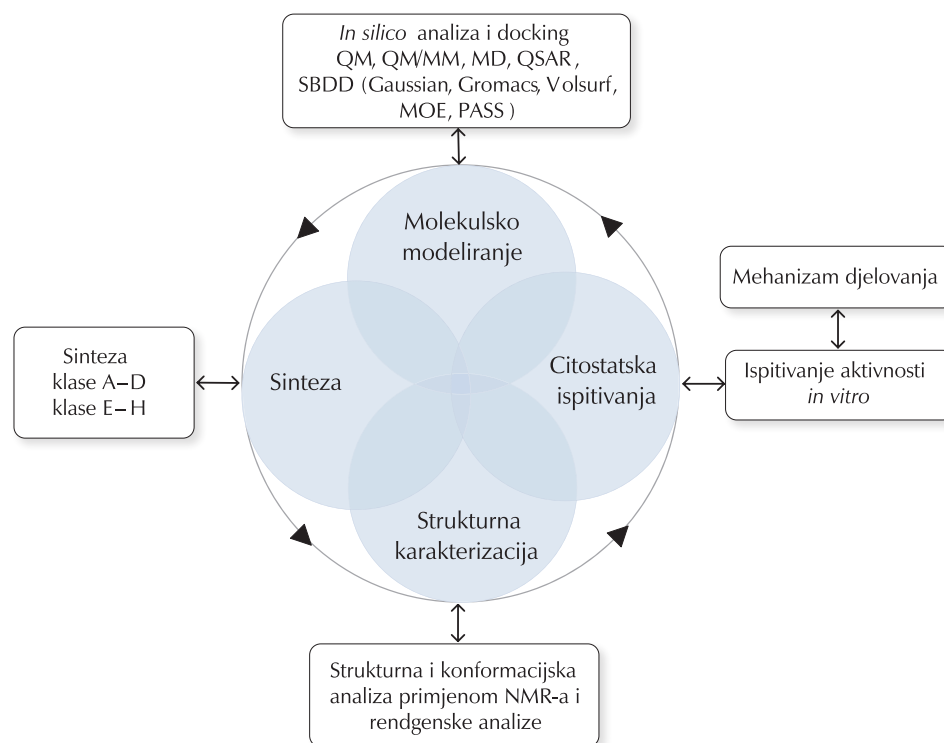
|| S. Raić-Malić*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilište u Zagrebu
Zavod za organsku kemiju
Marulićev trg 20, prizemno
10 000 Zagreb

Projekt “Sinteza i citostatska ispitivanja biblioteke novih dušikovih heterocikla”, SCIENCEENTRY (IP-11-2013-5596) financira Hrvatska zaklada za znanost u razdoblju od 2. lipnja 2014. do 30. svibnja 2018. godine. Projekt se temelji na interdisciplinarnim istraživanjima eksperata različitih znanstvenih disciplina, poput sintetske organske kemije, medicinske kemije, molekularne biologije, kemijske informatike i stanične biologije sa zajedničkim ciljem razvoja novih predvodnih spojeva koji bi se mogli primijeniti u

višim fazama razvoja protutumorskih lijekova. U okviru projekta ostvaruje se značajna suradnja istraživača iz četiri znanstvene institucije: Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (FKIT), Tekstilno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (TTF), Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci (OB) i Instituta Ruđer Bošković (IRB). Jedanaest suradnika (od ukupno petnaest) uključenih u rad na projektu zaposleno je na Zavodu za organsku kemiju (ZOK) FKIT-a, koji ima dugogodišnju tradiciju i ekspertizu u znanstvenim istraživanjima na polju sintetske organske kemije. U dosadašnjim istraživanjima djelatnika ZOK-a velik je napredak polučen na sintezi heterocikličkih protutumorskih i protuvirusnih djelotvornih spojeva u svrhu pronalaženja novih farmakološki aktivnih supstancija s boljim djelovanjem i selektivnošću, što je osnovni zahtjev za daljnje faze u razvoju lijekova.

Cilj projekta polučit će se međusobnim ispreplitanjem molekuskog modeliranja, sinteze i strukturne karakterizacije novih spojeva i njihovih bioloških ispitivanja *in vitro* (slika 1).

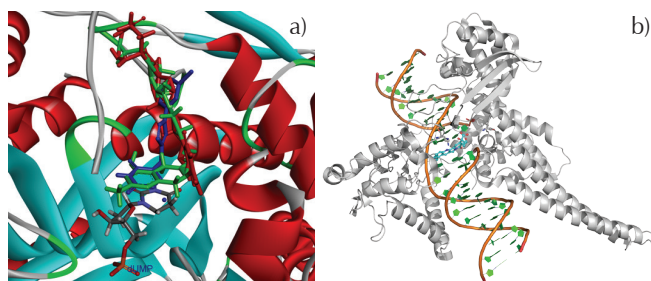


Slika 1 – Međusobno povezani zadaci i aktivnosti u radu projekta

* Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
e-pošta: sraic@fkit.hr

Različiti kemoinformatički (i bioinformatički) pristupi primjenjuju se kako bi se olakšao proces pronalazanja predvodnih molekula sa specifičnim biološkim učinkom: *in silico* odabir molekula za probir *in vitro*, pronalazjenje ciljane makromolekule (slika 2), molekulska uklapanje ako je 3D struktura ciljnog proteina dostupna, modeliranje kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (QSAR), *in silico* predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava kako bi se optimirala svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti (ADMET) molekula usporedno s optimiranjem njihovog protutumorskog djelovanja.

U nastavku istraživanja novih biološki aktivnih heterocikličkih spojeva provodi se sinteza biblioteke novih konjugata pseudopurina, kumarina i kinolina s 1,2,3-triazolnom jezgrom, *N*-acikličkih 5-nezasićenih pirimidinskih derivata, amino-, amido- i amidino supstituiranih derivata benzimidazola, benzotiazola i benzo[b]tieno-2-karboxamidnih derivata.



Slika 2 – a) Prikaz energetski najpovoljnijeg načina vezanja konjugata pirimidina i 1,2,3-triazola u aktivno mjesto timidilat-sintetaze (TS); b) umetanje (interkaliranje) spoja u DNA

U sintezi ciljanih spojeva primjenjuju se klasične metode organske sinteze kao i ekološki prihvatljive reakcije potpomognute mikrovalovima (slika 3a) i fotokemijske reakcije. Primjerice, 1,4-disupstituirani triazolni derivati sintetiziraju se reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije azida i alkena kataliziranom Cu(I), poznatom pod nazivom 'klik' reakcija, dok se alkinilni i heteroarilni supstituenti u ciljane spojeve uvode paladijem kataliziranim reakcijama unakrsnog povezivanja (Sonogashiraina i Stilleova reakcija).



Slika 3 – a) Mikrovalni reaktor (Milestone start S); b) sustav tekućinski kromatograf-spektrometar masa HPLC/MS/MS (Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS)

Strukturna karakterizacija i konformacijska analiza predstavničkih predloženih klasa provodi se primjenom 1D i 2D spektroskopije NMR, UV/Vis, fluorimetrijske i IR-spektroskopije, masene spektrometrije (slika 3b) i rendgenske strukturne analize.

U okviru bioloških ispitivanja novih spojeva provode se proliferacijski testovi spojeva u uvjetima *in vitro* na odabranim malignim tumorskim staničnim linijama poput karcinoma grlića maternice (HeLa), karcinoma debelog crijeva (SW 620), karcinoma gušterače (MiaPaCa-2), karcinoma dojke (MCF-7), karcinoma jetre (Hep-G2) i karcinoma pluća (A549), dok se citotoksičnost spojeva određuje na normalnim fibroblastima čovjeka (BJ i WI38). Za spojeve koji pokazuju snažno i selektivno djelovanje na rast stanica raka provode se ispitivanja mehanizma njihovog djelovanja (analiza mehanizma stanične smrti, analiza staničnog ciklusa, fluorescentna mikroskopija, analiza morfologije stanica i ekspresije pojedinačnih proteina metodom Western blot). Za pojedine spojeve provode se ispitivanja njihove interakcije s DNA/RNA kao potencijalne mete njihovog djelovanja (2b).

Na temelju rezultata primarnih testiranja *in vitro*, molekule s najboljim biološkim djelovanjima odabrat će se za daljnje optimiranje strukture s ciljem dobivanja predvodnih molekula. Strategija biozosterije primijenit će se u optimiranju strukture s ciljem dobivanja biološki aktivnijih molekula. Nadalje, primjenom molekulske hibridizacije, odnosno povezivanja dvaju ili više biološki aktivnih heterocikličkih sustava u novu strukturu (kemijski entitet) mogao bi se dobiti novi spoj s poboljšanim djelovanjem u odnosu na početne molekule. Pripravljena biblioteka spojeva rezultirat će pronalaskom spoja vodilje koji će se primijeniti u daljnjem optimiranju strukture da bi se dobio spoj s poboljšanim biološkim djelovanjem. To je ključni stupanj, odnosno polazna odrednica u zahtjevnom i izazovnom putu otkrivanja lijeka, kako bi se u nastavku uspješno provela faza optimiranja predvodne strukture. Sintetizirana biblioteka spojeva unutar projekta poslužiti će kao osnova za daljnje otkrivanje mogućih novih meta djelovanja, odnosno novih bioloških svojstava. Kako je jedan od ciljeva projekta istraživanje i razvoj "zelenih", okolišu prihvatljivih sintetskih metoda u organskoj sintezi, te metode, zbog svog blagotvornog djelovanja na okoliš, mogu naći i širu primjenu.

Pored znanstvene okosnice, projekt uključuje heurističku edukaciju mladih znanstvenika. U rad projekta uključeno je sedam znanstvenih novaka. Osim doktorskih radova, u okviru projekta izvode se završni i diplomski radovi studenata. Praktična znanja stečena tijekom trajanja projekta mladi će znanstvenici moći primijeniti u razvoju farmaceutske industrije koja je uvijek bila važan segment hrvatskog gospodarstva.

Primjena navedenih pristupa istraživanju rezultirat će u konačnici novim spoznajama koje će pomoći u razvoju protutumorskih lijekova i borbi protiv bolesti koja je globalni problem i drugi najčešći uzrok smrtnosti u Hrvatskoj (svaki četvrti smrtni slučaj u RH je posljedica karcinoma).