

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

(Załącznik 2a)

Krzysztof Zbigniew Łączkowski

Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum
Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Bydgoszcz 2017

SPIS TREŚCI:

I. Imię i Nazwisko.....	2
II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
IV. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311.):	
a) tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych.....	3
c) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz najbliższych planów naukowych	
a) pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....	27
b) najbliższe plany naukowe.....	32

I. IMIĘ I NAZWISKO

Krzysztof Zbigniew Łączkowski

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Licencjat chemii - Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2001. Tytuł pracy licencjackiej: *Katalityczne, enancjoselektywne wodorowanie ketonów.*

Magister chemii - Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2003. Tytuł pracy magisterskiej: *Synteza bromo- i aminoketonów dla enancjoselektywnej redukcji.*

Doktor nauk chemicznych - Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2008. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Asymetryczna synteza N-1-(1-fenyletylo)- oraz N-(2,3-dihydro-benzofuran-3-ylo)-N-hydroksymoczników.*

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.10.2002 – 31.09.2003: Asystent stażysta, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.10.2007 – 30.09.2008: Asystent, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.10.2010 – 31.12.2013: Asystent, Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medium, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

01.01.2014 – obecnie: Adiunkt, Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medium, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* 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. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych jest cykl 10 publikacji powiązanych tematycznie, opatrzony tytułem: **Czynniki strukturalne determinujące aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową pochodnych hydrazynyloazoli**. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych

Odnosniki do prac z cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe oznaczone zostały przedrostkiem **H**. Dla wszystkich cytowanych prac, których jestem współautorem, podano wartości wskaźnika *Impact factor* czasopism, w których się ukazały (według Journal Citation Reports), zgodnie z rokiem opublikowania. Dla prac które ukazały się drukiem w 2016 roku podano wartości wskaźnika za rok 2015. Dla każdego artykułu podano również liczbę punktów MNiSW.

Artykuły naukowe (**H-I – H-X**) wchodzące w skład w/w cyklu opublikowano w latach 2013 – 2016, a ich skumulowany współczynnik oddziaływania (Σ IF) wynosi **16,210**, co odpowiada **200** punktom MNiSW.

H-I. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Konrad Misiura, Anna Biernasiuk, Anna Malm, Agata Siwek, Tomasz Plech, Synthesis, antimicrobial activities and molecular docking studies of novel 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one based 2,4-disubstituted 1,3-thiazoles, *Lett. Drug Des. Discov.*, **2013**, 10, 798-807.

Impact factor 0,961; 15 punktów MNiSW

H-II. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Katarzyna Jachowicz, Konrad Misiura, Anna Biernasiuk, Anna Malm, Synthesis and biological evaluation of novel 2-(1H-imidazol-2-ylmethylidene)-hydrazinyl-1,3-thiazoles as potential antimicrobial agents., *Heterocycl. Commun.*, **2015**, 21, 109-114.

Impact factor 0,828; 15 punktów MNiSW

H-III. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Anna Biernasiuk, Angelika Baranowska-Łączkowska, Konrad Misiura, Anna Malm, Tomasz Plech, Agata Paneth, Synthesis, antibacterial activity, interaction with nucleobase and molecular docking studies of 4-formylbenzoic acid based thiazoles., *Med. Chem.* **2016**, *12*, 553-562.

Impact factor 1,458; 20 punktów MNiSW

H-IV. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Konrad Misiura, Anna Biernasiuk, Anna Malm, Agata Paneth, Tomasz Plech, Synthesis, antimicrobial activities and molecular docking studies of 1,3-thiazole derivatives incorporating adamantanyl moiety., *J. Heterocyclic Chem.* **2016**, *53*, 441-448.

Impact factor 0,685; 15 punktów MNiSW

H-V. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Konrad Misiura, Anna Biernasiuk, Anna Malm, Agata Siwek, Tomasz Plech, Emilia Ciok-Pater, Krzysztof Skowron, Eugenia Gospodarek, Synthesis, *in vitro* biological screening and molecular docking studies of novel camphor-based thiazoles, *Med. Chem.*, **2014**, *10*, 600-608.

Impact factor 1,363; 15 punktów MNiSW

H-VI. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Katarzyna Motylewska, Angelika Baranowska-Łączkowska, Anna Biernasiuk, Konrad Misiura, Anna Malm, Berta Fernández, Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high antifungal activity against *Candida* spp., *J. Mol. Struct.* **2016**, *1108*, 427-437.

Impact factor 1,780; 20 punktów MNiSW

H-VII. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Konrad Misiura, Anna Biernasiuk, Anna Malm, Discovery and evaluation of novel efficient selenazoles with high antifungal activity against *Candida* spp., *Med. Chem.*, **2015**, *11*, 118-127.

Impact factor 1,458; 20 punktów MNiSW

H-VIII. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Anna Biernasiuk, Angelika Baranowska-Łączkowska, Sylwia Zielińska, Kinga Sałat, Anna Furgala, Konrad Misiura, Anna Malm, Synthesis, antimicrobial and anticonvulsant screening of small library of tetrahydro-2H-thiopyran-4-yl based thiazoles and selenazoles., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*(S2), 24-39.

Impact factor 3,428; 25 punktów MNiSW

H-IX. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Konrad Misiura, Marta Świtalska, Joanna Wietrzyk, Angelika Baranowska-Łączkowska, Berta Fernández, Agata Paneth, Tomasz Plech, Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of thiazole-based nitrogen mustards. The hydrogen bonding interaction between model systems and nucleobases, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2014**, 14, 1271-1281.

Impact factor 2,469; 35 punktów MNiSW

H-X. Krzysztof Z. Łączkowski (✉), Marta Świtalska, Angelika Baranowska-Łączkowska, Tomasz Plech, Agata Paneth, Konrad Misiura, Joanna Wietrzyk, Barbara Czaplińska, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Katarzyna Malarz, Robert Musioł, Izabela Grela, Thiazole-based nitrogen mustards: design, synthesis, spectroscopic studies, DFT calculation, molecular docking, and antiproliferative activity against selected human cancer cell lines., *J. Mol. Struct.* **2016**, 1119, 139-150.

Impact factor 1,780; 20 punktów MNiSW

c) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W ciągu ostatnich dwóch dekad dramatycznie wzrosła częstość układowych zakażeń grzybiczych u pacjentów z nowotworami, osłabioną odpornością i chorych po przeszczepach narządów. Paradoksalnie związane jest to z postęпом w medycynie, stosowaniem inwazyjnych metod terapeutycznych, stosowaniem leków przeciwgrzybiczych o szerokim spektrum działania, leków immunosupresyjnych, leków przeciwnowotworowych oraz leków zwalczających AIDS. Coraz częstszym problemem jest uodparnianie się grzybów na stosowane leki, co jest dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia układowych zakażeń grzybiczych^{1,2,3}. Większość z tych zakażeń spowodowana jest przez grzyby z rodzaju *Candida* spp. (60-80% zakażeń) oraz *Aspergillus* spp., z czego ponad 50% zakażeń wywołana jest przez *Candida albicans*. Śmiertelność w układowych zakażeniach grzybiczych jest duża i sięga od 30 do 70%⁴. *Candida* spp. są czwartym najczęstszym patogenem izolowanym z krwi pacjentów w Stanach Zjednoczonych oraz ósmym w Europie. Grzyby te są odpowiedzialne za różne formy choroby, od powierzchownych zakażeń błony

¹ P. Grossi, C. Farina, R. Fiocchi, D. Dalla Gasperina, Prevalence and outcome of invasive fungal infections in 1,963 thoracic organ transplant recipients: a multicenter retrospective study. Italian study group of fungal infections in thoracic organ transplant recipients. *Transplantation*, **2000**, 70, 112-116.

² M. Nucci, K.A. Marr, Emerging fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 41, 521-526.

³ T.J. Walsh, A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides, E. Anaissie, Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10, 48-66.

⁴ P. Biliński, I. Seferyńska, K. Warzocha, Diagnostyka i leczenie układowych zakażeń grzybiczych w onkologii. *Onkol. Prak. Klin.* **2008**, 4, 15-24.

śluzowej i skóry do zakażeń ogólnoustrojowych, które w większości przypadków są zagrożeniem życia. *Candida albicans* i *Candida glabrata* stanowią około 80% zakażeń wywołanych przez *Candida* spp. izolowanych od pacjentów z kandydozą inwazyjną. W dalszej kolejności zakażenia te wywoływane są przez *Candida tropicalis* i *Candida parapsilosis*⁵. W terapii zakażeń grzybiczych stosuje się cztery grupy leków, a wśród nich antybiotyki polienowe (amfoterycyna B, nystatyna), azole (ketokonazol, flukonazol, itraconazol, worykonazol, posakonazol, rawukonazol), antymetabolity (flucytozyna) oraz echinokandyny (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina). Przez wiele lat do inwazyjnych zakażeń grzybiczych stosowano jedynie amfoterycynę B, jednak jej wysoka toksyczność uniemożliwia jej stosowanie zwłaszcza podczas długotrwałego leczenia. Na początku lat 90-tych tempo prowadzonych badań nad lekami przeciwgrzybiczymi znacząco wzrosło. Powstała pierwsza generacja triazoli (flukonazol i itraconazol), a potem druga generacja triazoli (worykonazol, posakonazol i rawukonazol), zmieniły epidemiologię zakażeń *Candida*. Flukonazol wykazuje aktywność wobec *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* i *Cryptococcus*, nie działa natomiast na *C. glabrata*, *C. krusei* oraz grzyby z rodzaju *Aspergillus*⁶. Worykonazol jest aktywny wobec *Candida*, *Cryptococcus* oraz *Aspergillus*, jak również wobec szczepów opornych na Flukonazol⁷. Posakonazol wykazuje szerokie spektrum działania wobec drożdżaków i pleśni opornych na amfoterycynę B, czy echinokandyny. Znalazł on również szerokie zastosowanie w leczeniu kandydozy przewodu pokarmowego oraz opornej aspergilozy⁸.

Problem lekooporności występuje również w przypadku bakterii. Według raportu WHO z 2014 roku, w niektórych krajach z powodu oporności *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* antybiotyki karbapenemowe i fluorochinolony stosowane do walki z tymi patogenami są nieskuteczne u ponad połowy osób zakażonych⁹. Według szacunków Europejskiej Agencji Leków (EMA), bakterie oporne na stosowane antybiotyki są w Europie przyczyną nawet 25 tysięcy zgonów rocznie¹⁰.

⁵ T.A. Clark, R.A. Hajjeh, Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2002**, 15, 569-574.

⁶ M.V. Martin, The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, 44, 429-437.

⁷ L. Jeu, F.J. Piacenti, A.G. Lyakhovetskiy, H.B. Fung, Voriconazole. *Clin. Ther.* **2003**, 25, 1321-1381.

⁸ G.M. Keating, Posaconazole. *Drugs* **2005**, 11, 1553-1567.

⁹ World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>.

¹⁰ a) The European Commission. Communication From The Commission On A Community Strategy Against Antimicrobial Resistance [Brussels, 20.06.2001, COM (2001) 333 final, volume 1],

b) http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf

Jeszcze większym problemem współczesnej cywilizacji są choroby nowotworowe, które stanowią obecnie drugą przyczynę zgonów na świecie¹¹. Według raportu WHO, w 2015 roku stwierdzono 14,1 miliona nowych przypadków raka oraz nastąpiło 8,8 mln zgonów w następstwie chorób nowotworowych. Najwyższą zachorowalność na raka obserwuje się w krajach szybko rozwijających się, a szacuje się, że liczba nowych przypadków raka będzie ciągle rosła, osiągając w 2025 roku wartość 19,3 miliona¹².

Znaczący wzrost lekooporności grzybów i bakterii oraz zachorowalności na nowotwory stał się dla mnie bodźcem do poszukiwania nowych, skutecznych leków stosowanych w terapii chorób zakaźnych jak również bardziej selektywnych leków przeciwnowotworowych o możliwie najmniejszej toksyczności w stosunku do zdrowych komórek.

Podczas studium literaturowego zauważyłem, że hydrazynyloazole wykazują szereg ciekawych aktywności biologicznych, w tym bardzo interesującą mnie aktywność przeciwdrobnoustrojową¹³ i przeciwnowotworową¹⁴. Ponadto charakteryzują się nieznaczną toksycznością w stosunku do zdrowych komórek¹³. W przypadku hydrazynyloselenazoli naukowcy w dużej mierze skupiają się jedynie na ich aktywności przeciwnowotworowej. Brak było również informacji w literaturze na temat potencjalnych celów molekularnych leżących u podstaw aktywności mikrobiologicznej hydrazynyloazoli. Ze względu na możliwy potencjał działania biologicznego, jak również na możliwość otrzymywania szerokiej gamy pochodnych, to właśnie w tej grupie związków postanowiłem poszukiwać nowych, skutecznych leków stosowanych w terapii chorób zakaźnych i chorób nowotworowych. To właśnie tej tematyce dedykowany jest niniejszy cykl 10 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2013-2016.

Pochodne hydrazynylootiazolu i hydrazynyloselenazolu o działaniu przeciwgrzybiczym i przeciwbakteryjnym

Mój pierwszy artykuł opublikowany w roku 2013 na łamach czasopisma Letters in Drug Design and Discovery (**H-I**) podejmuję dyskusję wpływu *para*-podstawionej grupy fenylovej na aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną hydrazynylootiazoli pochodnych

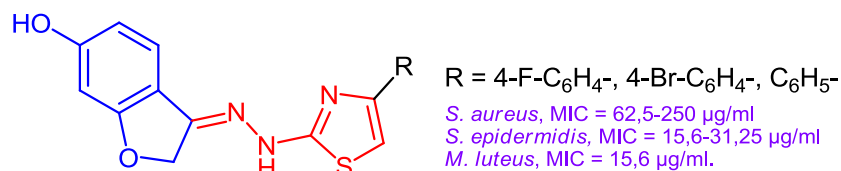
¹¹ P. Boyle, B. Levin, B. *World cancer report 2008*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. Reference available from: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs_online/wcr/2008/wcr_2008.pdf.

¹² J.S.I. Ferlay, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]; GLOBOCAN 2012 v1.0 2013*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, **2013**.

¹³ A. De Logu, M. Saddi, M.C. Cardia, R. Borgna, C. Sanna, B. Saddi, E. Maccioni, *In vitro* activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2005**, 55, 692-698.

¹⁴ A. Grozav Ignat, L. Gaina, V. Kuete, L. Silaghi-Dumitrescu, T. Efferth, V. Zaharia, Microwave-assisted synthesis of new selenazole derivatives with antiproliferative activity. *Molecules* **2013**, 18, 4679-4688.

6-hydroksybenzofuran-3(2H)-onu¹⁵. Spośród trzynastu przebadanych pochodnych, jedynie trzy pochodne zawierające podstawnik 4-fluorofenyłowy, 4-bromofenyłowy oraz fenyłowy wykazały od średniej do dobrej aktywności wobec testowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich *S. aureus* ATCC (MIC z ang. minimal inhibitory concentration - minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów, 62,5-250 µg/ml). Wymienione pochodne (Ryc. 1) wykazały wysoką do dobrej aktywności wobec *S. epidermidis* ATCC 12228 (MIC 15,6-31,25 µg/ml) oraz *M. luteus* ATCC 10240 (MIC 15,6 µg/ml).



Ryc. 1. Wybrane pochodne 6-hydroksybenzofuran-3(2H)-onu i ich aktywność przeciwbakteryjna

Otrzymane pochodne wykazały niewielką aktywność wobec szczepów *Candida albicans* (MIC 250-500 µg/ml), co było wynikiem bardzo rozczarowującym. Przeprowadzone badania wykazały brak aktywności pochodnej zawierającej podstawnik 4-acetyloaminofenyłowy wobec badanych szczepów bakterii i grzybów, co wstępnie eliminowałoby go z dalszych badań. Nie udało się również określić potencjalnego przeciwbakteryjnego celu molekularnego, a jedynie wykluczyć mechanizm działania przeciwbakteryjnego poprzez inhibicję syntezy peptydoglikanu. Przeprowadzone modelowanie molekularne dowiodło, że potencjalnymi przeciwgrzybiczymi celami molekularnymi dla otrzymanych pochodnych są N-mirystoiltransferaza (NMT), która jest odpowiedzialna za proces N-mirystoilacji ważnych białek komórki grzybiczej oraz proteaza aspartylowa (SAP), odpowiedzialna za proces adherencji komórek grzyba do nabłonka gospodarza, a następnie kolonizacji tkanek żywiciela. Nie stwierdzono jednak zależności między energią oddziaływania z enzymami a aktywnością. Przyczyn tego należy się dopatrywać w tym, że efekt przeciwgrzybiczy zależy od wielu czynników, takich jak trudności w penetracji przez błonę komórkową czy mechanizm efluksu, a oddziaływanie z celem molekularnym jest tylko jednym z nich. Analiza zależności między strukturą cząsteczek a ich aktywnością pozwoliła na wysunięcie **wstępnego założenia, że rodzaj zastosowanego podstawnika wpływa na aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną pochodnych hydrazynylotiazoli**. Aby zweryfikować powyższe założenie otrzymano dziewięć hydrazynylotiazoli pochodnych imidazolu, który charakteryzuje się wysoką polarnością i amfoterycznym charakterem.

¹⁵ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, A. Siwek, T. Plech, Synthesis, antimicrobial activities and molecular docking studies of novel 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one based 2,4-disubstituted 1,3-thiazoles. *Lett. Drug Des. Discov.* **2013**, 10, 798-807.

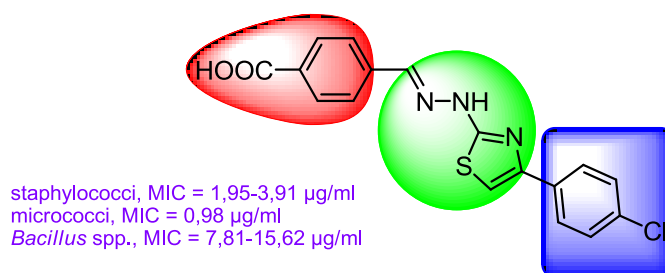
Szczegółowe wyniki badań mikrobiologicznych dla serii hydrazynylotiazoli pochodnych imidazolu stanowi przedmiot artykułu opublikowanego w roku 2015 na łamach czasopisma *Heterocyclic Communications* (**H-II**)¹⁶. Otrzymane związki zostały następnie poddane ocenie aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej. Otrzymana aktywność przeciwdrobnoustrojowa dla tych pochodnych okazała się zdecydowanie wyższa. Pochodne zawierające podstawnik 4-bromofenylowy oraz adamantylowy wykazały od wysokiej do bardzo wysokiej aktywności wobec *Staphylococcus* spp. ATCC (MIC 7,81-15,62 µg/ml), *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (MIC 1,95-3,91 µg/ml) oraz *Bacillus* spp. ATCC (MIC 3,91-15,62 µg/ml). Również pochodna zawierająca podstawnik 4-fluorofenylowy wykazała interesującą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich (MIC 15,62-250 µg/ml). Pochodna 4-fluorofenylowa wykazała najwyższą aktywność wobec *M. luteus* ATCC (MIC 15,62 µg/ml). Dodatkowo pochodne 4-bromofenylowa oraz adamantylowa okazały się być bardzo aktywne również wobec *Candida* spp. (MIC 3,91-31,25 µg/ml). Przeprowadzone badania **potwierdzają wstępne założenie**, że rodzaj podstawnika determinuje aktywność hydrazynylotiazoli oraz że pochodne zawierające podstawnik 4-acetyloaminofenylowy są nieaktywne wobec badanych szczepów bakterii i grzybów. Bardzo interesujące okazały się wyniki oznaczeń mikrobiologicznych dla pochodnej adamantylowej. W cząsteczce tej brak jest pierścienia fenylowego, a pierścień adamantylu przyłączony jest bezpośrednio do heterocyklicznego pierścienia tiazolu. Otrzymana pochodna wykazała wysoką aktywność wobec wszystkich badanych szczepów bakterii i grzybów (MIC 3,91-31,25 µg/ml). Przyczynę tak dobrych wyników dla tej pochodnej należy upatrywać w tym, że układ adamantylu może zwiększać lipofilowość cząsteczki, co umożliwia łatwiejszy transport związku przez błonę komórkową bakterii i grzybów. Dotychczas przeprowadzone badania pokazują, że hydrazynylotiazole będące pochodnymi ketonu lub aldehydu zawierającego pierścień aromatyczny wykazują wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż przeciwgrzybiczą¹⁷. Natomiast dodanie cykloalkilowego podstawnika zwiększa wykazywaną aktywność przeciwgrzybiczą związków¹⁸. Na tym etapie badań postanowiłem zmodyfikować strukturę hydrazynylotiazoli tak, aby w pierwszej kolejności wykazywały aktywność wyłącznie wobec bakterii. Wyniki tych badań zastały przedstawione w artykule opublikowanym w roku 2016 na

¹⁶ K.Z. Łączkowski, K. Jachowicz, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, Synthesis and biological evaluation of novel 2-(1*H*-imidazol-2-ylmethylidene)hydrazinyl-1,3-thiazoles as potential antimicrobial agents., *Heterocycl. Commun.*, **2015**, 21, 109-114.

¹⁷ S.K. Bharti, G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 651-660.

¹⁸ F Chimenti, B. Bizzarri, E. Maccioni, D. Secci, A. Bolasco, R. Fioravanti, P. Chimenti, A. Granese, S. Carradori, D. Rivanera, D. Lilli, A. Zicari, S. Distinto, Synthesis and in vitro activity of 2-thiazolylhydrazones derivatives compared with the activity of clotrimazole against clinical isolates of *Candida* spp., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4635-4640.

łamach czasopisma *Medicinal Chemistry* (**H-III**)¹⁹. Projektując nowe pochodne hydrazynylotiazolu wziąłem pod uwagę cząsteczkę kwasu benzoesowego, który od wielu lat stosowany jest jako środek konserwujący ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe²⁰. Związki te zostały następnie zsyntetyzowane i poddane ocenie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Przeprowadzone badania potwierdziły, że otrzymane pochodne wykazują aktywność jedynie wobec bakterii. Pochodna 4-chlorofenylowa (Ryc. 2) wykazała bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec staphylococci (MIC 1,95-3,91 µg/ml), micrococci (MIC 0,98 µg/ml) oraz *Bacillus* spp. (MIC 7,81-15,62 µg/ml).



Ryc. 2. Charakterystyczne elementy strukturalne pochodnej 4-chlorofenylowej

Pochodne 4-metylofenylowa, 4-bromofenylowa, 4-metoksyfenylowa oraz adamantylowa wykazały wysoką aktywność wobec staphylococci (MIC 3,91-31,25 µg/ml), micrococci (MIC 0,98-15,62 µg/ml) oraz *Bacillus* spp. (MIC 1,95-125 µg/ml). Warte podkreślenia jest również wysoka wrażliwość szczepu *Bacillus cereus* na otrzymane pochodne, a w szczególności na pochodną adamantylową, dla której aktywność wobec *Bacillus cereus* wynosi (MIC 1,85 µg/ml). *Bacillus cereus* nie stanowi zagrożenia dla ludzi, jednak ze względu na genetyczne podobieństwo do *Bacillus anthracis* (czynnika etiologicznego wąglika) jest wykorzystywany we wstępnych badaniach wyłaniających potencjalne leki przeciwwąglkowe. Przyjmuje się, że prawdopodobieństwo odkrycia substancji przeciwwąglkowej jest wyższe w grupie takich związków, których działanie przeciwbakteryjne potwierdzono uprzednio na szczepie *Bacillus cereus*²¹. Przeprowadzone badania potwierdzają wcześniejszą obserwację, że pochodne 4-bromofenylowa oraz adamantylowa odgrywają znaczącą rolę w uzyskaniu aktywności przeciwbakteryjnej

¹⁹ K.Z. Łączkowski, A. Biernasiuk, A. Baranowska-Łączkowska, K. Misiura, A. Malm, T. Plech, A. Paneth, Synthesis, antibacterial activity, interaction with nucleobase and molecular docking studies of 4-formylbenzoic acid based thiazoles., *Med. Chem.* **2016**, 12, 553-562.

²⁰ G.O Adeshina, J.A. Onaolapo, Studies on the efficacy of some preservatives used in packaged orange drinks. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **2012**, 6, 1513-1518.

²¹ M. Berlanga, M.T. Montero, J. Hernandez-Borrell, M. Vinas, Influence of the cell wall on ciprofloxacin susceptibility in selected wild-type Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 23, 627-630.

hydrazynylotiazoli. Obiecującymi grupami, które wykazały pozytywny wpływ na aktywność przeciwbakteryjną pochodnych kwasu benzoowego, są grupy 4-chlorofenylowa, 4-metylofenylowa, 4-metoksyfenylowa oraz adamantylowa. Korzystając z dostępnego online programu ALOGPS 2.1 dla wszystkich pochodnych obliczono wartość $\log P$ ²². Obliczenia te pokazały, że dla najbardziej aktywnych związków wartość $\log P$ mieści się w przedziale od 4,21 do 4,95. Związki o wartości $\log P$ poniżej 4,21 nie wykazują aktywności przeciwbakteryjnej. Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że **lipofilowość może odgrywać znaczącą rolę w uzyskaniu aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej**. Zaskakującym wynikiem jest tutaj brak aktywności przeciwbakteryjnej pochodnej 4-fluorofenylowej. Otrzymane wyniki pokazują również, że **podstawniki 4-nitrofenylowy, 4-cyjanofenylowy oraz oksochromenylowy nie wpływają na uzyskanie aktywności przeciwbakteryjnej**. Przeprowadzone dokowania hydrazynylotiazoli pochodnych kwasu benzoowego do miejsca wiązania liganda w wybranych enzymach bakteryjnych dawały podstawy do twierdzenia, iż otrzymane związki mogą inhibować gyrazę B, co może być jednym z możliwych mechanizmów działania przeciwbakteryjnego.

Do podjęcia badań kwantowo-mechanicznych nad oddziaływaniem hydrazynylotiazoli pochodnych kwasów karboksylowych z zasadami DNA skłoniły mnie dane literaturowe mówiące o otrzymaniu struktury krystalograficznej kompleksu kwasu benzoowego z cytozyną^{23,24}. **Ten zasługujący na szczególną uwagę temat nie był dotychczas podejmowany przez innych badaczy**. Podjęte badania miały na celu wskazanie, które zasady DNA najsilniej oddziałują z modelową cząsteczką kwasu benzoowego, a następnie z otrzymanymi hydrazynylotiazolami pochodnymi kwasu benzoowego. Na początku zaproponowałem szereg możliwych sposobów oddziaływań między pochodnymi kwasów karboksylowych a adeniną, guaniną, cytozyną i tyminą. Optymalizację parametrów geometrycznych kompleksów przeprowadzono w przybliżeniu DFT/B3LYP stosując bazę 6-311G**. Dla zoptymalizowanych struktur obliczono energię wiązania i energię oddziaływania w przybliżeniu DFT stosując funkcjonal Minnesota M06-2X²⁵ oraz bazę 6-311++G**. Wszystkie obliczenia przeprowadzono za pomocą programu Gaussian 09²⁶. Obliczenia kwantowo-mechaniczne rozpoczęto od modelowych obliczeń energii wiązania i energii oddziaływania między kwasem benzoowym i 4-chlorofenylową pochodną

²² ALOGPS 2.1 program, <http://www.vcclab.org>.

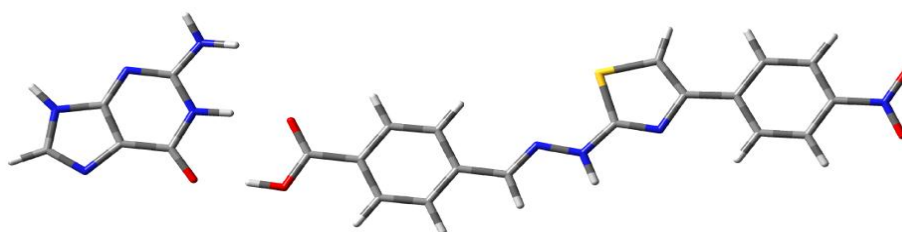
²³ S.R. Perumalla, E. Suresh, V.R. Pedireddi, Nucleobases in molecular recognition: molecular adducts of adenine and cytosine with COOH functional groups. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 7752-7757.

²⁴ B. Sridhar, J.B. Nanubolu, K. Ravikumara, Competition between the two-point and three-point synthon in cytosine-carboxylic acid complexes. *CrystEngComm*, **2012**, *14*, 7065-7074.

²⁵ Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Account.* **2006**, *120*, 215-241.

²⁶ M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, et al. (2009) gaussian 09, Revision C.01, A.02. Gaussian, Inc., Wallingford.

a czterema zasadami DNA (adeniną, guaniną, cytozyną i tyminą). Obliczenia pokazały, że kwas benzoesowy i pochodna 4-chlorofenyłowa najsilniej oddziałują z guaniną i cytozyną. Dlatego też dalsze obliczenia energii wiązania i energii oddziaływania przeprowadzono dla pozostałych kompleksów hydrazynylotiazoli jedynie z guaniną i cytozyną. Energia wiązania i energia oddziaływania dla tych kompleksów okazały się nie zależeć od rodzaju zastosowanego podstawnika. Efekty elektronowe grup znajdujących się w pozycji 4 w pierścieniu fenyłowym nie mają znaczącego wpływu na grupę karboksylową znajdującą się na drugim końcu cząsteczki. Przeprowadzone obliczenia pokazują, że cząsteczka leku może selektywnie rozpoznawać i wiązać się z cząsteczkami guaniny lub cytozyny, które mogą wchodzić w skład bakteryjnego DNA (Ryc. 3).



Ryc. 3. Sposób oddziaływania pochodnej kwasu benzoesowego z cząsteczką guaniny

Na podstawie dotychczasowych wyników testów mikrobiologicznych, modelowania molekularnego oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych należało przypuszczać, że hydrazynylotiazole zawierające motyw kwasu benzoesowego stanowią potencjalny kierunek poszukiwań skutecznych chemoterapeutyków przeciwbakteryjnych, których mechanizm działania polegałby na inhibicji bakteryjnej gyrazy B oraz selektywnym oddziaływaniu z guaniną lub cytozyną, będącymi strukturalną częścią bakteryjnego DNA. Jak wcześniej zauważono, dodanie cykloalkilowego podstawnika adamantyłowego zwiększa wykazywaną aktywność przeciwgrzybiczą związków. Może to wynikać z wysokiej lipofilowości, która charakteryzuje układ adamantyłu. **W celu zweryfikowania hipotezy** o wpływie lipofilowości na bioaktywność hydrazynylotiazoli, zaprojektowałem, a następnie poddałem ocenie aktywności mikrobiologicznej serię hydrazynylotiazoli pochodnych tricyklicznego układu 2-adamantanonu. Wyniki tych badań opublikowałem w roku 2016 na łamach czasopisma *Journal of Heterocyclic Chemistry* (**H-IV**)²⁷. Otrzymane wyniki badań mikrobiologicznych pokazały, że pochodna 4-fluorofenyłowa wykazuje bardzo wysoką aktywność przeciwko grzybom *Candida* spp. (MIC 1,95-15,62 µg/ml). Również pochodna 4-metoksyfenyłowa oraz 4-bromofenyłowa wykazały dobrą aktywność przeciwko grzybom *Candida* spp. (MIC 15,62-

²⁷ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, A. Paneth, T. Plech, Synthesis, antimicrobial activities and molecular docking studies of 1,3-thiazole derivatives incorporating adamantanyl moiety., *J. Heterocyclic Chem.* **2016**, 53, 441-448.

31,25 µg/ml). Dla istotnej aktywności przeciwbakteryjnej niezbędna okazała się grupa 4-hydroksyfenylowa. Pochodna ta wykazała dobrą aktywność wobec *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* oraz *Bacillus subtilis* (MIC 31,25-62,5 µg/ml). Porównując wyniki badań mikrobiologicznych z obliczonymi za pomocą programu ALOGPS 2.1 wartościami lipofilowości można zauważyć, że najbardziej aktywne pochodne mają wartość logP w przedziale od 5,62 do 6,05. Poniżej lub powyżej tych wartości hydrazynyliotiazole nie wykazują znaczącej aktywności. Przeprowadzone badania **potwierdzają wstępne założenie**, że lipofilowość determinuje aktywność przeciwgrzybiczą hydrazynyliotiazoli. Potwierdza się również wcześniejsza obserwacja, że **podstawniki 4-nitrofenylowy oraz 4-cyjanofenylowy niekorzystnie wpływają na aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą otrzymanych pochodnych**. Przeprowadzone modelowanie molekularne potwierdza wcześniejsze badania, że potencjalnymi przeciwgrzybiczymi celami molekularnymi dla hydrazynyliotiazoli są N-mirystoiltransferaza (NMT) oraz proteaza aspartylowa (SAP), gdyż w obu przypadkach powinowactwo wszystkich otrzymanych pochodnych do wymienionych enzymów jest wyższe aniżeli stosowanego leku odniesienia. Na tym etapie badań **postanowiłem również przetestować wpływ modyfikacji układu cykloalkilowego na aktywność przeciwgrzybiczą**. Dlatego też postanowiłem zmniejszyć wielkość układu cykloalkilowego, przechodząc od wcześniej badanego tricyklicznego układu 2-adamantanonu do bicyklicznego układu kamfory. Kamfora należy do terpenów, które zgodnie z literaturą mogą łatwo penetrować lipofilową błonę komórkową²⁸, wykazując obiecującą aktywność przeciwko *Candida albicans*²⁹ oraz są inhibitorami tworzenia biofilmu przez *S. aureus*³⁰. Mając to na uwadze, zdecydowałem się zaprojektować i poddać badaniom mikrobiologicznym dwanaście hydrazynyliotiazoli pochodnych bicyklicznej kamfory. Wyniki tych badań opublikowałem w roku 2014 na łamach czasopisma Medicinal Chemistry (H-V)³¹. Zsyntetyzowane pochodne poddano testom oceniającym ich aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii Gram-dodatnich staphylococci, micrococci oraz bacilli jak również aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Candida* spp. Otrzymana po raz pierwszy w moich badaniach pochodna benzoksazolinowa wykazała bardzo wysoką aktywność wobec *S. aureus* ATCC i *S. epidermidis* ATCC 12228 (MIC 0,98-7,81 µg/ml) oraz dobrą aktywność wobec *S. aureus* NIL (uzyskany z Narodowego Instytutu Leków

²⁸ F. Lombardo, M.Y. Shalaeve, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Abraham, ElogP_{oct}: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 2922-2928.

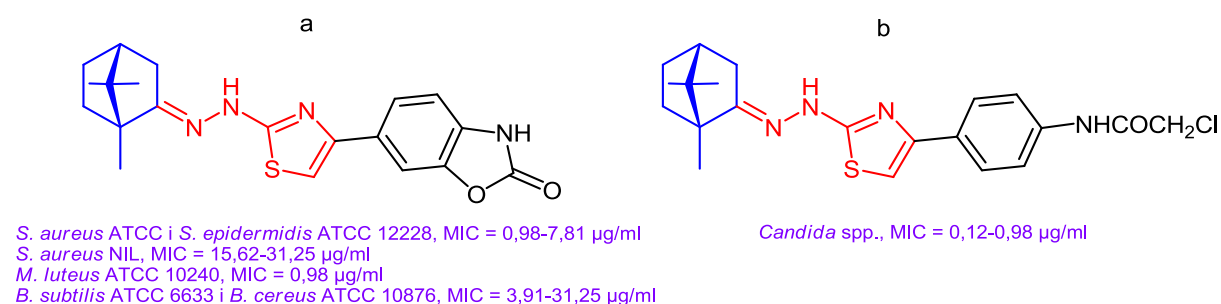
²⁹ J.G. Rheinwald, A.M. Chakrabarty, I.A. Gunsalus, A Transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1973**, 70, 885-889.

³⁰ A. Espinel-Ingroff, Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Rev. Iberoam. Micol.*, **2009**, 26, 15-22.

³¹ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, A. Siwek, T. Plech, E. Ciok-Pater, K. Skowron, E. Gospodarek, Synthesis, *in vitro* biological screening and molecular docking studies of novel camphor-based thiazoles, *Med. Chem.*, **2014**, 10, 600-608.

w Warszawie) (MIC 15,62-31,25 µg/ml). Pochodna ta wykazała bardzo wysoka aktywność również wobec *M. luteus* ATCC 10240 (MIC 0,98 µg/ml). Wykazywana przez pochodną benzoksazolinową aktywność wobec micrococci jest identyczna jak antybiotyku ciprofloksacyny. Pochodna benzoksazolinowa wykazała również wysoką aktywność wobec *B. subtilis* ATCC 6633 i *B. cereus* ATCC 10876 (MIC 3,91-31,25 µg/ml).

Szczególnie korzystna dla przeciwgrzybiczego efektu działania okazała się obecność fragmentu 4-chloroacetyloaminofenyłowego w strukturze otrzymanych pochodnych. Pochodna 4-chloroacetyloaminofenyłowa wykazała bardzo wysoką aktywność wobec grzybów z rodzaju *Candida* spp. (MIC 0,12-0,98 µg/ml) (Ryc. 4). Badana pochodna była ośmiokrotnie bardziej aktywna wobec *C. albicans* ATCC 10231 i dwukrotnie bardziej aktywna wobec *C. parapsilosis* ATCC 22019, aniżeli powszechnie stosowany lek Flukonazol.



Ryc. 4. Selektywna aktywność pochodnych benzoksazolinowej (**a**) oraz 4-chloroacetyloaminofenyłowej (**b**) wobec badanych drobnoustrojów

Zadziwiający jest jednak fakt, że pochodne 4-bromofenyłowa, 4-metoksyfenyłowa oraz 4-fluorofenyłowa, które w wcześniejszych badaniach wykazały pozytywny wpływ na aktywność przeciwbakteryjną, w tym przypadku dają efekt negatywny. Przeprowadzone modelowanie molekularne również potwierdziło, że potencjalnymi celami molekularnym dla hydrazynylotiazoli pochodnych kamfory są N-mirystoiltransferaza (NMT) oraz proteaza aspartylowa (SAP), gdyż w obu przypadkach powinowactwo pochodnych do wymienionych celów molekularnych jest wyższe, aniżeli stosowany lek odniesienia.

Biorąc pod uwagę fakt, że pochodna benzoksazolinowa wykazała bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną, postanowiłem otrzymać serię hydrazynylotiazoli pochodnych aldehydu octowego, acetonu, cyklobutanonu, cyklopentanonu, cykloheksanonu, cyklododekanonu oraz 2-adamantanonu zawierających podstawnik benzoksazolinowy. Niestety, wyniki oznaczeń aktywności przeciwbakteryjnej były mocno rozczarowujące. Spośród dwudziestu pięciu testowanych mikroorganizmów, jedynie *M. luteus* ATCC 10240 okazał się

w niewielkim stopniu wrażliwy na testowane pochodne (MIC 31,25-1000 µg/ml)³². Otrzymane rezultaty skłaniają do rezygnacji z podstawnika benzoksazolinowego, który jak się okazało nie generuje oczekiwanej aktywności przeciwbakteryjnej. Konsekwentnie przechodząc w swoich badaniach od tricyklicznego układu 2-adamantanonu poprzez bicykliczny układ kamfory, postanowiłem poddać badaniom monocykliczny układ cykloheksanu.

Kontynuację omówionej powyżej tematyki stanowi artykuł opublikowany w 2016 roku na łamach czasopisma Journal of Molecular Structure (**H-VI**)³³. Skupiam się w nim na opisie aktywności dwunastu otrzymanych hydrazynyliotiazoli oraz ośmiu pilotażowych hydrazynyloselenazoli pochodnych cykloheksanokarboksyaldehydu. Badania mikrobiologiczne przeprowadzone na grupie dwudziestu siedmiu referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów (*Candida albicans* ATCC 2091, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) oraz na dziesięciu szczepach klinicznych (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima* oraz *C. sake*) potwierdziły ich wysoką skuteczność. Pochodne 4-fluorofenylowa, 4-metylofenylowa, metylenokarboksyetylowa oraz metylowa wykazały bardzo wysoką aktywność wobec *Candida albicans* ATCC oraz *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (MIC 0,49-7,81 µg/ml). Hydrazynyliotiazole zawierające grupy 4-fluorofenylową, 4-metoksyfenylową, 4-metylofenylową, 2,4-difluorofenylową, metylenokarboksyetylową oraz metylową wykazały bardzo wysoką aktywność wobec szczepów *Candida* spp. wyizolowanych z materiałów klinicznych (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, *Candida famata*, *Candida lusitaniae*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis* i *Candida dubliniensis*) (MIC 0,24-15,62 µg/ml). **Aktywność przeciwgrzybicza wielu z otrzymanych hydrazynyliotiazoli pochodnych cykloheksanokarboksyaldehydu jest porównywalna, a często nawet wyższa niż aktywność stosowanego w chorobach grzybiczych leku Flukonazolu.** Stwierdzono, że otrzymane hydrazynyliotiazole są nieaktywne wobec badanych szczepów bakterii. Natomiast hydrazynyloselenazole zawierające podstawniki 4-nitrofenylowy, 4-fluorofenylowy, 4-cyjanofenylowy, 4-bromofenylowy, 4-chlorofenylowy oraz 4-metylofenylowy wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich, zarówno patogennych staphylococci, *Staphylococcus aureus* ATCC (MIC 31,25-125 µg/ml) jak i oportunistycznych bakterii *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (MIC 7,81-31,25 µg/ml). Otrzymane hydrazynyloselenazole wykazują

³² K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, I. Grela, Synthesis and antimicrobial activities of novel 6-(1,3-thiazol-4-yl)-1,3-benzoxazol-2(3H)-one derivatives, *Heterocycl. Commun.* **2014**, 20, 41-46.

³³ K.Z. Łączkowski, K. Motylewska, A. Baranowska-Łączkowska, A. Biernasiuk, K. Misiura, A. Malm, B. Fernández, Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high antifungal activity against *Candida* spp., *J. Mol. Struct.* **2016**, 1108, 427-437.

również pewne aktywności przeciwgrzybicze. Na szczególną uwagę zasługują tutaj pochodne 4-metylofenylowa i metylenokarboksyetylowa (MIC 7,81-62,5 µg/ml). Reasumując, pochodne 4-fluorofenylowa, 2,4-difluorofenylowa, 4-metoksyfenylowa, 4-metylofenylowa, metylenokarboksyetylowa oraz metylowa wykazały największą aktywność przeciwgrzybiczą. Interesujące z punktu widzenia właściwości elektronowych jest to, że pochodna 4-fluorofenylowa wykazała znacznie wyższą aktywność przeciwgrzybiczą niż grupy 4-chlorofenylowa i 4-bromofenylowa. Wynika to prawdopodobnie z elektroujemnych właściwości atomu fluoru. Pochodne 4-nitrofenylowa i 4-trifluorofenylowa nie wykazały aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej. Bardzo ważnym wynikiem eksperymentalnym jest to, że podstawienie atomu wodoru w pozycji 5 w pierścieniu tiazolu skutkuje całkowitą utratą aktywności przeciwgrzybiczej, a w pierścieniu selenazolu utratą aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej. Ponadto, zastąpienie atomu siarki atomem seleniu skutkuje zmniejszeniem aktywności przeciwgrzybiczej otrzymanych w ten sposób hydrazynyloselenazoli. Obserwuje się jednak zdecydowane zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych analogów selenowych w stosunku do ich analogów siarkowych. W roku 2010 Bharti i współpracownicy¹⁷ otrzymali 4-bromofenylowe i 4-metoksyfenylowe hydrazynylo-tiazole pochodne cyklopentanonu i cykloheksanonu. Przeprowadzone przez nich badania mikrobiologiczne wykazały, że związki te są skuteczne wobec grzybów *Candida albicans*, *Candida neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Candida tropicalis* (MIC 12,5 µg/ml). Kontynuując swoje badania, postanowiłem zsyntetyzować osiemnaście hydrazynyloselenazoli pochodnych cykloheksanonu i 2-metylocykloheksanonu i poddać je badaniom mikrobiologicznym na grupie dwudziestu pięciu referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów (*Candida albicans* ATCC 2091, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) oraz na piętnastu szczepach klinicznych (*C. albicans* (3 izolaty), *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lambica* oraz *C. pulcherrima*). Otrzymane wyniki chciałem porównać z moimi wcześniejszymi wynikami, jak również z wynikami otrzymanymi przez Bhartiego. Wyniki tych badań opublikowałem w roku 2015 na łamach czasopisma Medicinal Chemistry (**H-VII**)³⁴. Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna wykazała, że pochodne 4-bromofenylowa, 4-fluorofenylowa, 4-cyjanofenylowa oraz 4-metoksyfenylowa wykazały bardzo wysoką aktywność wobec *C. albicans* ATCC 10231 i *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC 0,24-7,81 µg/ml). Pochodne 4-bromofenylowa, 4-fluorofenylowa oraz 4-cyjanofenylowa wykazały również bardzo wysoką aktywność wobec grzybów wyizolowanych z materiałów klinicznych *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. parapsilosis* i *C. dubliniensis*.

³⁴ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, Discovery and evaluation of novel efficient selenazoles with high antifungal activity against *Candida* spp., *Med. Chem.*, **2015**, *11*, 118-127.

(MIC 0,24-7,81 µg/ml). **Wiele z otrzymanych pochodnych wykazało aktywność przeciwgrzybiczą porównywalną, a nawet wielokrotnie wyższą aniżeli stosowany w chorobach grzybiczych lek Flukonazol.** Pochodne 4-metoksyfenylowe wykazały bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. epidermidis* oraz *M. luteus* (MIC 1,95-3,91 µg/ml). Dodatkowo pochodna adamantylowa wykazała bardzo wysoka aktywność wobec *M. luteus* (MIC 3,91 µg/ml). Można zdecydowanie stwierdzić, że otrzymane hydrazynyloselenazole wykazują wyższą aktywność przeciwgrzybiczą, jak i przeciwbakteryjną, aniżeli analogi siarkowe otrzymane przez Bhartiego. Dodatkowo, otrzymane hydrazynyloselenazole pochodne cykloheksanonu i 2-metylocykloheksanonu wykazują znacznie wyższą aktywność przeciwgrzybiczą niż otrzymane wcześniej hydrazynyloselenazole pochodne cykloheksanokarboksyaldehydu.

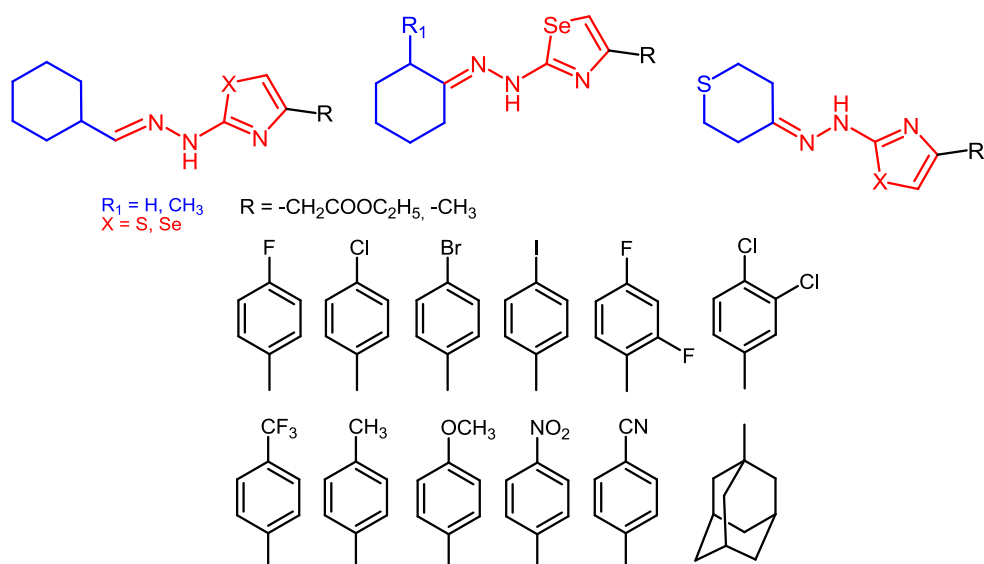
Potwierdzeniem istotnej roli, jaką w generowaniu efektu przeciwgrzybiczego i przeciwbakteryjnego odgrywa struktura układu cykloalkilowego jest artykuł opublikowany w 2016 roku na łamach czasopisma Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (**H-VIII**)³⁵. Zaprojektowano i zsyntetyzowano dwanaście hydrazynylootiazoli i dziesięć hydrazynyloselenazoli pochodnych dihydro-2*H*-thiopyran-4(3*H*)-onu. W tym przypadku postanowiono zbadać wpływ heteroatomu znajdującego się w układzie cykloheksanonu na aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną zsyntetyzowanych związków. Otrzymane pochodne poddano badaniom mikrobiologicznym na grupie trzydziestu referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów (*Candida albicans* ATCC 2091, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019), pleśni (*Aspergillus niger* ATCC 16404) oraz na trzynastu szczepach klinicznych (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. sake*, *C. kefyr*, *C. glabrata* oraz *C. tropicalis*). Przeprowadzona analiza mikrobiologiczna wykazała, że hydrazynylootiazole zawierające podstawniki 4-fluorofenylowy, 4-chlorofenylowy, 4-jodofenylowy, 4-bromofenylowy, 4-metoksyfenylowy, 4-metylofenylowy, 4-cyjanofenylowy, metylenokarboksyetylowy, metylowy oraz hydrazynyloselenazole zawierające podstawniki 4-chlorofenylowy, 4-jodofenylowy, 4-metoksyfenylowy wykazały bardzo wysoką aktywność wobec *Candida* spp. (MIC 1,95-16,52 µg/ml). Wszystkie wymienione powyżej pochodne, z wyjątkiem pochodnej 4-metoksyfenylowej, wykazały również bardzo wysoką aktywność wobec grzybów wyizolowanych z materiałów klinicznych *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* oraz *C. inconspicua* (MIC 0,98-16,52 µg/ml). Ze wszystkich otrzymanych związków tylko hydrazynyloselenazole zawierające podstawniki

³⁵ K.Z. Łączkowski, A. Biernasiuk, A. Baranowska-Łączkowska, S. Zielińska, K. Sałat, A. Furgała, K. Misiura, A. Malm, Synthesis, antimicrobial and anticonvulsant screening of small library of tetrahydro-2*H*-thiopyran-4-yl based thiazoles and selenazoles., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31(S2), 24-39.

4-chlorofenyłowy, 4-jodofenyłowy, 4-metoksyfenyłowy, 4-metylofenyłowy, 4-bromofenyłowy, 4-trifluorofenyłowy, 4-nitrofenyłowy i 4-cyjanofenyłowy wykazały wysoką aktywność wobec *Staphylococcus* spp. i *Micrococcus* spp. Wymienione związki były aktywne wobec bakterii oportunistycznych takich jak *S. epidermidis* ATCC 12228 i *M. luteus* ATCC 10240 (MIC 7,81-62,5 µg/ml) oraz bakterii patogennej *S. aureus* ATCC (MIC 7,81-125 µg/ml). Otrzymane hydrazynylotiazole nie wykazały aktywności wobec badanych bakterii. Wyjątkiem są tutaj pochodne metylenokarboksyetylowa i metylowa, które wykazały aktywność wobec Gram-ujemnej bakterii *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 (MIC 15,62-31,25 µg/ml). Ze względu na to, że *Bordetella bronchiseptica* jest bakterią wywołującą choroby układu oddechowego u kotów i psów powodując u nich ostre zapalenia oskrzeli i tchawicy, otrzymane pochodne mogą stać się dobrym punktem wyjścia do poszukiwania nowych leków zwalczających ten patogen³⁶.

Reasumując, hydrazynylotiazole zawierające podstawniki 4-fluorofenyłowy, 4-chlorofenyłowy, 4-jodofenyłowy, 4-bromofenyłowy, 4-metoksyfenyłowy, 4-metylofenyłowy oraz 4-cyjanofenyłowy wykazały bardzo wysoką aktywność przeciwgrzybiczą. Również związki, w których pierścień tiazolu w pozycji 4 zawiera grupy metylenokarboksyetylową lub metylową, wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwgrzybiczą (Ryc. 5). Podstawienie atomu wodoru w pozycji 5 w pierścieniu tiazolu skutkuje całkowitą utratą aktywności przeciwgrzybiczej, co jest zgodne z wcześniejszą obserwacją. Dodatkowo, aktywność hydrazynylotiazoli wobec grzybów jest wyższa od ich analogów selenowych. Ponadto, hydrazynyloselenazole wykazują działanie przeciwbakteryjne, którego brak jest w przypadku ich analogów siarkowych. Można stwierdzić, że obecność heteroatomu siarkowego pozytywnie wpływa na wykazywaną aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych pochodnych.

³⁶ B.F. Woolfrey, J.A. Moody, Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1991**, 4, 243-255.

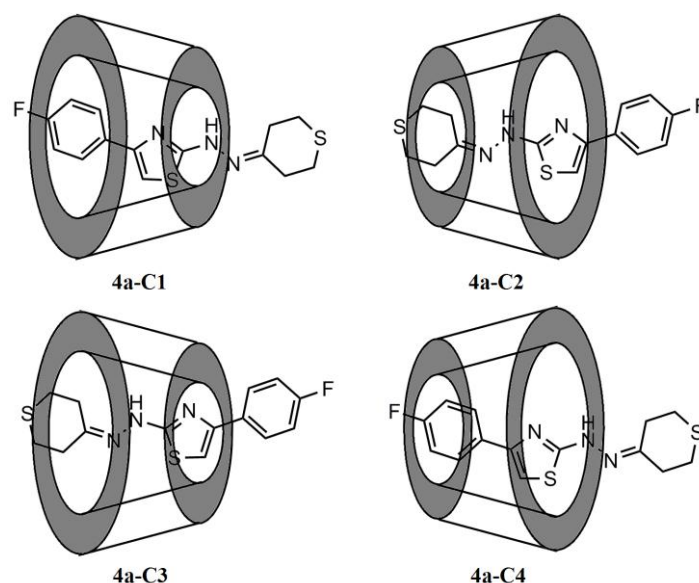


Ryc. 5. Wzory ogólne badanych hydrazynyloazoli (publikacje **H-VI**, **H-VII**, **H-VIII**)

Obecny gwałtowny rozwój terapii farmakologicznych skierowany jest na dokładne poznanie mechanizmów dystrybucji leków w organizmie i na rozwój nowych form ich transportu (DDS- Drug Delivery System)³⁷. Jednym z najbardziej obiecujących nośników leków są cyklodekstryny, które wykazują dużą zdolność do tworzenia kompleksów inkluzyjnych ze względu na możliwość tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Obliczenia stabilności kompleksów leków z beta-cyklodekstrynami są znane w literaturze, ale ze względu na ich duży czas obliczeń są wykonywane za pomocą metod mechaniki molekularnej³⁸. W moich badaniach postanowiłem użyć metod mechaniki kwantowej, która jest metodą bardziej czasochłonną, lecz uzyskane wyniki są znacznie dokładniejsze. Badania rozpoczęto od optymalizacji czterech możliwych kompleksów beta-cyklodekstryny z hydrazynylofiazolem zawierającym podstawnik 4-fluorofenyłowy (Ryc. 6, oznaczenia zaczerpnięte z publikacji **H-VIII**). Optymalizację przeprowadzono w przybliżeniu DFT/B3LYP stosując bazę 6-31G^{**}. Dla tak zoptymalizowanych kompleksów obliczono energię oddziaływania i energię wiązania stosując funkcjonal Minnesota M06-2X oraz bazy 6-31G^{**} i 6-311G^{**}. Otrzymane energie oddziaływania i wiązania na poziomie -26,9 kcal/mol i -18,8 kcal/mol dla kompleksu 4a-C1 potwierdziły, że hydrazynylofiazole mogą tworzyć trwałe połączenia z beta-cyklodekstryną i że beta-cyklodekstryna może być z powodzeniem stosowana jako nośnik dla tych leków.

³⁷ A. Singh, Z.A. Worku, G. Van den Mooter, Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, 8, 1361-1378.

³⁸ A. Fífere, N. Marangoci, S. Maier, A. Coroaba, D. Maftci, M. Pinteala, Theoretical study on β -cyclodextrin inclusion complexes with propiconazole and protonated propiconazole. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 2191-2201.



Ryc. 6. Cztery możliwe sposoby oddziaływania pochodnej 4-fluorofenylowej z beta-cyklodekstryną

Podsumowując, otrzymano szereg hydrazynyloazoli o wysokiej aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej. W wielu przypadkach aktywność przeciwgrzybicza była wyższa niż aktywność stosowanego w chorobach grzybiczych leku Flukonazolu. Otrzymane wyniki dowodzą, że hydrazynylootiazole i hydrazynyloselenazole stanowią grupę potencjalnych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Przeprowadzone badania ujawniły również szereg zależności między strukturą potencjalnych leków a ich aktywnością biologiczną, co w znaczący sposób może pomóc w projektowaniu nowych, efektywnych leków stosowanych w terapii chorób zakaźnych. Ustalono również potencjalne cele molekularne odpowiedzialne za aktywność przeciwdrobnoustrojową hydrazynylootiazoli. Otrzymane rezultaty są dla mnie punktem wyjścia do prowadzenia dalszych, dogłębnych badań nad biologiczną aktywnością hydrazynyloazoli.

Pochodne hydrazynylootiazolu o działaniu przeciwnowotworowym

Znaczące miejsce w terapii chorób nowotworowych odgrywają leki alkilujące, a szczególnie iperyty azotowe³⁹. Spośród tysięcy zsyntetyzowanych iperytów azotowych tylko kilka znalazło zastosowanie w leczeniu nowotworów, np. chlorambucyl, cyklofosfamid, ifosfamid oraz melfalan. Leki te są stosowane w leczeniu chorób układu krwiotwórczego, chłoniaków, szpiczaków, jak również ostrych białaczek. Iperyty azotowe bardzo łatwo alkilują DNA, głównie w pozycjach N7 i O6 w guaninie, N1 i N3 w adeninie i N3 w cytozynie. Ich wysoka reaktywność połączona z niespecyficznym wiązaniem się z DNA powoduje, że związki te są

³⁹ S. Puyo, D. Montaudon, P. Pourquier, From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Review. Oncol. Hematol.*, **2014**, 89, 43-61.

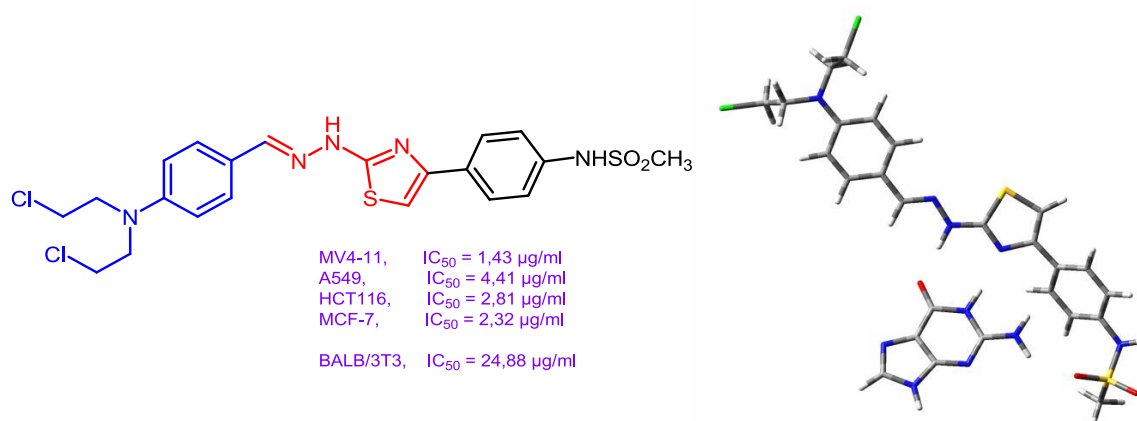
wysoko toksyczne, a ich stosowanie prowadzi do poważnych skutków ubocznych, w tym wtórnych nowotworów^{40,41}.

Ze względu na to, że układ tiazolu i jego pochodne charakteryzują się małą toksycznością, potwierdzoną w badaniach na liniach komórkowych Vero przez De Logu i współpracowników¹³ oraz w badaniach prowadzonych przez Chimenti i współpracowników¹⁸, postanowiłem zaprojektować, a następnie zsyntetyzować szereg pochodnych hydrazynyliotiazolu zawierających grupę iperytową. Połączenie tych dwóch farmakoforów miało za zadanie stworzyć leki, które wykazywałyby zdolność hamowania namnażania komórek nowotworowych oraz charakteryzowałyby się stosunkowo niską toksycznością względem komórek zdrowych. Pierwsze badania nad aktywnością przeciwnowotworową tych związków opublikowałem w roku 2014 na łamach czasopisma *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (H-IX)*⁴². Osiem zsyntetyzowanych pochodnych zostało przebadanych na ludzkiej bifenotypowej białaczce mielomonocytovej (MV4-11), ludzkim raku płuc (A549), ludzkim raku piersi (MCF-7), raku jelita grubego (HCT116) oraz na prawidłowych mysich fibroblastach (Balb/3T3). Ze wszystkich badanych związków, pochodne 4-bromofenylowa, 4-nitrofenylowa, 4-metanosulfonamidofenylowa oraz adamantylowa wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkiej bifenotypowej białaczki mielomonocytovej (MV4-11), (IC_{50} z ang. half maximal inhibitory concentration - połowa maksymalnego stężenia hamującego, 0,634-3,61 $\mu\text{g/ml}$). Dodatkowo, toksyczność pochodnej 4-bromofenylowej wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3) okazała się 40 razy niższa niż wobec komórek nowotworowych. Przeprowadzone badania pokazują również, że pochodna 4-metanosulfonamidofenylowa wykazała bardzo wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkiego raka piersi (MCF-7), raka jelita grubego (HCT116), (IC_{50} 2,32 $\mu\text{g/ml}$ i 2,81 $\mu\text{g/ml}$), jak również wobec ludzkiego raka płuc (A549), (IC_{50} 4,41 $\mu\text{g/ml}$) (Ryc. 7). Dodatkowo toksyczność pochodnej 4-metanosulfonamidofenylowej wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3) jest 9 razy niższa niż wobec komórek nowotworowych. Aktywność tej pochodnej jest porównywalna do aktywności *cis*-platyny, która jest używana w leczeniu guzów litych. Można również stwierdzić, że wszystkie otrzymane hydrazynyliotiazole pochodne iperytu azotowego wykazują od 11 do 40 razy niższą toksyczność niż *cis*-platyna, stosowana w tych badaniach jako lek odniesienia.

⁴⁰ J.M. Kaldor, N.E. Day, K. Hemminki, Quantifying the carcinogenicity of antineoplastic drugs. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1988**, 24, 703-711.

⁴¹ M.R. Osborne, P.D. Lawley, C. Crofton-Sleigh, W. Warren, Products from alkylation of DNA in cells by melphalan: human soft tissue sarcoma cell line RD and Escherichia coli WP2. *Chem. Biol. Interact.*, **1995**, 97, 287-296.

⁴² K.Z. Łączkowski, K. Misiura, M. Świtalska, J. Wietrzyk, A. Baranowska-Łączkowska, B. Fernández, A. Paneth, T. Plech, Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of thiazole-based nitrogen mustards. The hydrogen bonding interaction between model systems and nucleobases, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2014**, 14, 1271-1281.



Ryc. 7. Aktywność pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej wobec linii komórkowych ludzkiej białaczki MV4-11, ludzkiego raka płuc A549, ludzkiego raka jelita grubego HCT116, ludzkiego raka piersi MCF-7 oraz mysich fibroblastów (linia prawidłowa) BALB/3T3. Sposób oddziaływania pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej z guaniną

Poznanie mechanizmu oddziaływania nowych związków z DNA jest kluczowe w dalszym projektowaniu leków posiadających wyższą aktywność i mniejszą toksyczność. Mechanizm działania iperytów azotowych jest stosunkowo dobrze poznany, jednak nie wyjaśnia on różnic aktywności związków w zależności od ich budowy. Jednym z takich zagadnień zajęli się Polavarapu i współpracownicy, którzy wyjaśnili różnice w aktywności przeciwnowotworowej między alifatycznymi a aromatycznymi pochodnymi iperytów azotowych stosując metody mechaniki kwantowej⁴³.

Do podjęcia badań kwantowo-mechanicznych nad oddziaływaniem hydrazynylotiazoli z zasadami DNA była chęć wyjaśnienia różnic w aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych pochodnych. **Ten zasługujący na szczególną uwagę temat nie był dotychczas podejmowany przez innych badaczy.** Postawiłem również wstępną hipotezę, że **przed docelową reakcją alkilowania następuje proces oddziaływania leku z określonym fragmentem DNA.** Takie oddziaływanie stabilizowałoby cały układ i umożliwiałoby wydajniejszy proces alkilowania. Podjęte badania miały na celu wskazanie, które zasady DNA najsilniej oddziałują z dwoma modelowymi cząsteczkami 2-aminotiazolu i 2-(2-metylenohydrazynylo)tiazolu oraz 4-metanosulfonamidofenyłową pochodną hydrazynylotiazolu, która w badaniach przeciwnowotworowych okazała się być najbardziej aktywna. Na początku zaproponowałem szereg możliwych sposobów oddziaływań między pochodnymi tiazolu a adeniną, guaniną, cytozyną i tyminą. W następnej kolejności przeprowadzono optymalizację parametrów geometrycznych kompleksów i obliczono ich

⁴³ A. Polavarapu, J.A. Stillabower, S.G.W. Stubblefield, W.M. Taylor, M.-H. Baik, The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards-A computational study. *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 5914-5921.

energię oddziaływania oraz energię wiązania. Wszystkie obliczenia były przeprowadzane za pomocą programu Gaussian 09²⁶. Obliczenia wykazały, że modelowy 2-aminotiazol najsilniej oddziałuje z guaniną, następnie z cytozyną, tyminą i najslabiej z adeniną. Tą samą zależność otrzymano dla drugiego modelowego 2-(2-metylenohydrazynylo)tiazolu, który również okazał się najmocniej oddziaływać z guaniną. W przypadku najaktywniejszej pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej oddziaływanie z guaniną jest najmocniejsze (Ryc. 7), następnie z cytozyną, adeniną i tyminą. Jednakże oddziaływanie z adeniną i tyminą jest prawie identyczne. Energia oddziaływania pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej z guaniną jest większa od energii oddziaływania 2-aminotiazolu i 2-(2-metylenohydrazynylo)tiazolu z guaniną. Fakt ten można wyjaśnić tworzeniem się dodatkowego wiązania wodorowego między grupą NH₂ guaniny a jednym atomem O z grupy metanosulfonamidofenyłowej, który jeszcze bardziej stabilizuje kompleks (Ryc. 7). Tego rodzaju dodatkowego wiązania wodorowego nie zaobserwowano w przypadku innych kompleksów, co przemawia za tym, że nowo powstałe wiązanie wodorowe może odpowiadać za wysoką aktywność przeciwnowotworową pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej. Otrzymane wyniki obliczeń wstępnie potwierdzają postawioną hipotezę, że selektywne oddziaływanie z guaniną może ułatwiać późniejszą reakcję alkilowania, która w przypadku pochodnej 4-metanosulfonamidofenyłowej doprowadziła do uzyskania wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo, dla zaprojektowanych związków przeprowadzone zostały symulacje oddziaływań z DNA-zależną hTopoll, która stanowi punkt uchwytu dla związków przeciwnowotworowych^{44,45}. Topoizomerazy regulują zmiany konformacyjne w DNA, ułatwiają przeprowadzanie takich procesów, jak replikacja, transkrypcja i rekombinacja oraz odgrywają ważną rolę w kondensacji chromosomów⁴⁶. Przeprowadzone modelowanie molekularne wykazało, że otrzymane pochodne są inhibitorami hTopoll, jednak nie udało się stwierdzić zależności między energią oddziaływania z enzymem, a uzyskaną aktywnością przeciwnowotworową. W celu umożliwienia przyszłej komercjalizacji otrzymane wyniki stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego, w którym jestem głównym autorem⁴⁷. Mając na uwadze fakt, że pochodna 4-metanosulfonamidowa wykazała wysoką aktywność przeciwnowotworową, postanowiłem zaprojektować i zsyntetyzować dziesięć hydrazynyliotiazoli pochodnych iperytu

⁴⁴ Y. Fu, S. Zhou, Y. Liu, Y. Yang, X. Sun, C. Li, The cytotoxicity of benzaldehyde nitrogen mustard-2-pyridine carboxylic acid hydrazone being involved in topoisomerase II α inhibition. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 2014, 52742.

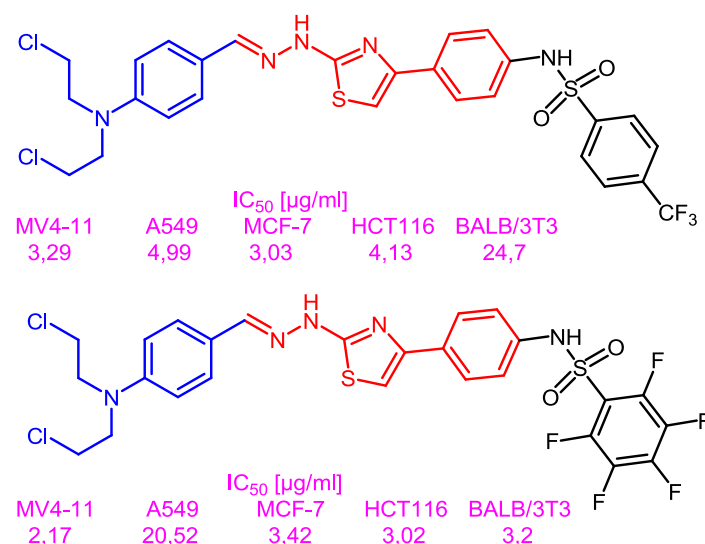
⁴⁵ V.A. Bacherikov, T.C. Chou, H.J. Dong, C.H. Chen, Y.W. Lin, T.J. Tsai, T.L. Su, Potent antitumor N-mustard derivatives of 9-anilinoacridine, synthesis and antitumor evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4719-4722.

⁴⁶ U. Kellner, M. Sehested, P.B. Jensen, F. Gieseler, P. Rudolph, Culprit and victim-DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol.*, **2002**, 3, 235-243.

⁴⁷ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, Nowe ((4-podstawione)tiazol-2-ylo)hydrazono-metylo)-N,N-bis(2-chloro-etylo)aniliny i sposób ich wytwarzania, Zgłoszenie patentowe do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej, P.405530, data zgłoszenia: 03.10.2013.

azotowego, zawierających szereg strukturalnie różnych grup sulfonamidowych. Kontynuację omówionej powyżej tematyki stanowi artykuł opublikowany w 2016 roku na łamach czasopisma *Journal of Molecular Structure* (**H-X**)⁴⁸. Dziesięć otrzymanych pochodnych zostało przebadanych w pierwszej kolejności na ludzkiej bifenotypowej białaczce mielomonocytozowej (MV4-11). Pochodne 4-fluorobenzenosulfonamidowa, 4-cyjanobenzenosulfonamidowa, 4-(trifluorometylo)benzenosulfonamidowa, 4-metoksybenzenosulfonamidowa oraz 2,3,4,5,6-pentafluorobenzenosulfonamidowa wykazały bardzo wysoką aktywność przeciwnowotworową, osiągając wartość IC_{50} 2,17-4,26 $\mu\text{g/ml}$. Należy tutaj podkreślić, że pochodna 4-fluorobenzenosulfonamidowa charakteryzuje się również 17 razy niższą toksycznością wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3) w porównaniu do badanej nowotworowej linii komórkowej. Następnie pięć najbardziej aktywnych związków przebadano na ludzkim raku płuc (A549), ludzkim raku piersi (MCF-7), raku jelita grubego (HCT116) oraz na prawidłowych mysich fibroblastach (Balb/3T3). Dalsze badania wykazały, że pochodna 4-(trifluorometylo)benzenosulfonamidowa wykazuje bardzo wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkiego raka płuc (A549), ludzkiego raka piersi (MCF-7) oraz raka jelita grubego (HCT116) (IC_{50} 3,03-4,99 $\mu\text{g/ml}$). Otrzymana pochodna charakteryzuje się również 5-8 razy niższą toksycznością wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3), niż przeciwko badanym nowotworowym liniom komórkowym. Również pochodna zawierająca podstawnik 4-metoksybenzenosulfonamidowy wykazała bardzo wysoką aktywność wobec ludzkiego raka płuc (A549) i ludzkiego raka piersi (MCF-7) (IC_{50} 4,58 $\mu\text{g/ml}$ i 4,18 $\mu\text{g/ml}$). Niezwykle ważne jest, że pochodna ta nie wykazała toksyczności wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3). Pochodną najbardziej aktywną wobec ludzkiego raka piersi (MCF-7) oraz raka jelita grubego (HCT116) okazała się pochodna pentafluorobenzenosulfonamidowa (IC_{50} 3,42 $\mu\text{g/ml}$ oraz 3,02 $\mu\text{g/ml}$). Otrzymana aktywność jest porównywalna do *cis*-platyny. Związek ten charakteryzuje się podobną toksycznością wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3) (IC_{50} 3,2 $\mu\text{g/ml}$), jednak wciąż jest to wartość dwukrotnie mniejsza niż toksyczność *cis*-platyny wobec prawidłowych mysich fibroblastów (Balb/3T3), (IC_{50} 1,4 $\mu\text{g/ml}$) (Ryc. 8).

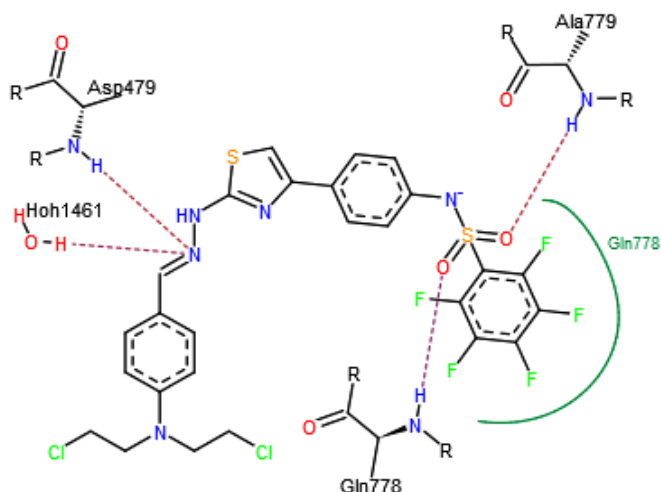
⁴⁸ K.Z. Łączkowski, M. Świtalska, A. Baranowska-Łączkowska, T. Plech, A. Paneth, K. Misiura, J. Wietrzyk, B. Czaplińska, A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, R. Musioł, I. Grela, Thiazole-based nitrogen mustards: design, synthesis, spectroscopic studies, DFT calculation, molecular docking, and antiproliferative activity against selected human cancer cell lines., *J. Mol. Struct.* **2016**, 1119, 139-150.



Ryc. 8. Porównanie aktywności pochodnych 4-(trifluorometylo)benzenosulfonamidowej oraz 2,3,4,5,6-pentafluorobenzenosulfonamidowej wobec linii komórkowych ludzkiej białaczki MV4-11, ludzkiego raka płuc A549, ludzkiego raka piersi MCF-7, ludzkiego raka jelita grubego HCT116 oraz mysich fibroblastów (linia prawidłowa) BALB/3T3

Związki zawierające podstawniki 4-metylobenzenosulfonamidowy, 4-izopropylbenzenosulfonamidowy oraz 4-tertbutylobenzenosulfonamidowy wykazały słabą aktywność wobec ludzkiej bifenotypowej białaczki mielomonocytowej (MV4-11) (IC₅₀ 32,68-54,62 μg/ml). Analiza SAR pokazuje, że najwyższą aktywność przeciwnowotworową wykazują związki zawierające grupy elektrono-akceptorowe. Pochodne zawierające grupy elektrono-donorowe, takie jak grupa metylowa, izo-propylowa i *tert*-butylowa, wykazują słabą aktywność przeciwnowotworową. Wyjątek stanowi tutaj wysoce aktywna pochodna zawierająca elektrono-donorową grupę metoksylową. Przeprowadzone badania wyłoniły dwie najbardziej aktywne pochodne zawierające grupy 4-(trifluorometylo)benzenosulfonamidową oraz 2,3,4,5,6-pentafluorobenzenosulfonamidową. Kolejnym etapem badań było zbadanie mechanizmu działania tych pochodnych. Specjalnie do tego celu zaprojektowano cząsteczkę hydrazynylotiazolu pochodnego iperytu azotowego, która zawierała w swojej strukturze grupę dansylową. Obecność fluorescencyjnej grupy dansylowej oraz odpowiednie właściwości spektroskopowe cząsteczki umożliwiły przeprowadzenie badania prawdopodobnego miejsca akumulacji pochodnej w komórce nowotworowej za pomocą metod spektroskopowych. Dodatkowo, związek ten nie wykazywał toksyczności, co umożliwiło przeprowadzenie odpowiednich badań bez uszkodzenia komórki nowotworowej. Przeprowadzone badania wykazały, że związek ten akumuluje się głównie w błonie komórkowej i w pewnym stopniu w lizosomach, co może wynikać z jego wysokiej lipofilowości (logP 7,52). Może to tłumaczyć jego zupełny brak aktywności przeciwnowotworowej, jak również brak aktywności przeciwnowotworowej pochodnej

4-izopropylobenzeno-sulfonamidowej oraz 4-*tert*-butylobenzenosulfonamidowej, gdyż obliczona za pomocą programu ALOGPS 2.1 wysoka lipofilowość tych związków, logP 7,17 oraz 7,52 może ułatwiać gromadzenie się ich w lipofilowej błonie komórkowej. Stwierdzono, że związek ten nie akumuluje się w jądrze komórkowym, więc nie może alkilować znajdującego się tam DNA. Z drugiej strony stwierdzono, że pochodna dansylowa częściowo gromadzi się również w mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym. Rezultat ten potwierdza możliwość alkilowania mitochondrialnego DNA przez ten związek, ale również przez pozostałe pochodne. Ponadto, szczególnie wśród nowych leków przeciwnowotworowych pojawiają się inne od wymienionych, nietypowe mechanizmy działania. Wykazano, że pochodne iperytów siarkowych indukują stres retikulum endoplazmatycznego, co może być również prawdopodobnym mechanizmem działania opisanych pochodnych. Następnie, postanowiono kontynuować badania kwantowo-mechaniczne rozpoczęte w (H-IX)⁴² nad oddziaływaniem hydrazynyliotiazoli z zasadami DNA. We wcześniejszych badaniach ustalono, że pochodna metanosulfonamidowa najsilniej oddziałuje z guaniną, tworząc z nią trzy wiązania wodorowe, co bardzo stabilizuje powstały kompleks. Parametry geometryczne dla najbardziej aktywnych benzenosulfonamidów zoptymalizowano przy użyciu metody DFT/B3LYP stosując bazę 6-311G**. Natomiast energię wiązania i oddziaływania obliczono za pomocą DFT/M06-2X/6-311++G**. Z przeprowadzonych obliczeń kwantowo-mechanicznych wynika, że wszystkie badane związki bardzo silnie oddziałują z guaniną (~-29 kcal/mol), również energia wiązania jest wysoka (~-24 kcal/mol). Wyjątek stanowi tutaj pochodna pentafluorobenzenosulfonamidowa dla której energia oddziaływania wynosi -26 kcal/mol i jest mniejsza o 7 kcal/mol od energii wiązania. Spowodowane jest to dużą deformacją monomerów podczas tworzenia kompleksu. Stwierdzono również, że rodzaj podstawnika przyłączonego do pierścienia benzenowego jedynie nieznacznie wpływa na energię oddziaływania i energię wiązania w badanych kompleksach. Otrzymane energię oddziaływania i wiązania są porównywalne z energią oddziaływania i wiązania dla wcześniej badanego kompleksu pochodnej metanosulfonamidowej z guaniną (-27,6 kcal/mol i -23,4 kcal/mol). Modelowanie molekularne wykazało, że najbardziej aktywna pochodna pentafluorobenzenosulfonamidowa wykazuje największe powinowactwo do DNA-zależnej hTopoII. Powstały kompleks jest stabilizowany przez trzy wiązania wodorowe z Asp479, Gln778, Ala779, jedno wiązanie wodorowe z cząsteczką wody Hoh1461 oraz powstałe wiązanie hydrofobowe grupy pentafluorofenylowej z Gln778 (Ryc. 9).



Ryc. 9. Powinowactwo pochodnej 2,3,4,5,6-pentafluorobenzenosulfonamidowej do DNA-zależnej hTopoII

Podsumowując utworzenie cząsteczek hybrydowych zaowocowało opracowaniem nowej grupy leków przeciwnowotworowych cechujących się wysoką aktywnością i bardzo niską toksycznością oraz wskazało dalszy kierunek badań nad pochodnymi hydrazynylotiazolu.

Badania były wykonywane we współpracy z naukowcami z Katedry Mikrobiologii Farmaceutycznej (UM Lublin), Katedry Chemii Organicznej (UM Lublin), Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej (PAN Wrocław), Zakładu Fizyki Teoretycznej i Informatyki (UKW Bydgoszcz), Department of Physical Chemistry and Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials (USC Santiago de Compostela, Hiszpania), Zakładu Chemii Organicznej (UŚ Katowice), Instytutu Fizyki im. Augusta Chełkowskiego (UŚ Chorzów) oraz Katedry Mikrobiologii (CM UMK Bydgoszcz).

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH ORAZ NAJBLIŻSZYCH PLANÓW NAUKOWYCH

a) pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

Studia chemiczne ukończyłem w roku 2003 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu broniąc pracę magisterską na temat syntezy bromo- i aminoketonów dla enancjoselektywnej redukcji. W latach 2003-2008 moje zainteresowania badawcze skupiały się wokół metod asymetrycznej syntezy *N*-hydroksymoczników, enancjoselektywnej redukcji eterów oksymów oraz addycji dietylocynku do benzaldehydów. W tym okresie opracowałem wydajne metody enancjoselektywnej redukcji eterów benzytowych oksymów do amin za pomocą boranu wobec chiralnych oksazaborolidyn z wysoką wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym.

Opracowałem również asymetryczne syntezy szeregu *N*-hydroksymoczników oraz acetamidów z nadmiarami enancjomerycznymi sięgającymi 99% ee^{49,50}. Czteroletnie badania nad tymi zagadnieniami zostały uwieńczone w roku 2008 stopniem doktora nauk chemicznych, który uzyskałem na podstawie rozprawy o asymetrycznej syntezie *N*-1-(1-fenyl-2-etylo)- oraz *N*-(2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)-*N*-hydroksymoczników przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Zaidlewicza. W tym okresie opracowałem również chiralne ligandy pochodne norefedryny, które zastosowano z powodzeniem do enancjoselektywnej addycji dietylocynku do benzaldehydów⁵¹. Za moje największe osiągnięcie z tamtego okresu uważam opracowanie stereoselektywnej syntezy szeregu β -aminoalkoholi pochodnych terpenów 2-karenu, 3-karenu, α -pinenu i β -pinenu oraz kamfenu⁵². Otrzymane aminoalkohole można z powodzeniem stosować jako chiralne ligandy do enancjoselektywnej redukcji ketonów, eterów oksymów oraz imin. Na sposób wytwarzania β -aminoalkoholi terpenowych został udzielony w 2014 patent, w którym jestem głównym twórcą⁵³. Przeprowadzone w tym czasie optymalizacje geometrii i obliczenia energii oddziaływania kompleksów boranu z B-podstawionymi oksazaborolidynami pochodnymi karenowych aminoalkoholi wykazały, że B-metylopodstawione i B-trifluorometylopodstawione kompleksy mają 2,5 raza większą energię oddziaływania niż pozostałe badane kompleksy. Dodatkowo zaobserwowano tworzenie się wiązania B-H-B, które stabilizuje kompleks⁵⁴. Wysoka niestabilność kompleksów boranu z oksazaborolidynami oraz wrażliwość na wilgoć uniemożliwia ich wydzielanie i przechowywanie. Jak dotąd udało się wyizolować jedynie dwa takie kompleksy^{55,56}. Być może rozwiązaniem tego problemu byłoby poszukiwanie trwałych połączeń tego typu wśród kompleksów charakteryzujących się dużymi wartościami energii oddziaływania. Jestem również współautorem przeglądowej pracy o zastosowaniu tetrahydro-1-metyl-3,3-diphenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*][1,3,2]oxazaborolu, który jest

⁴⁹ K.Z. Łączkowski, M.P. Pakulski, M.P. Krzemiński, P.Jaisankar, M. Zaidlewicz, Asymmetric synthesis of *N*-substituted *N*-hydroxyureas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 788-795.

⁵⁰ K.Z. Łączkowski, Asymmetric synthesis of novel (1*H*-benzo[d]imidazol-2-ylthio)- and (di-*n*-butylamino-2-ylthio)acetamides, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **2013**, 70, 237-244.

⁵¹ M. Jaworska, K.Z. Łączkowski, M. Welniak, M. Welke, A. Wojtczak, Imines derived from (1*S*,2*R*)-norephedrine as catalysts in the enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes, *Appl. Catal. A: Gen.*, **2009**, 357, 150-158.

⁵² K.Z. Łączkowski, A. Kmiecik, A. Kozakiewicz, Stereoselective synthesis of new monoterpene β -amino-alcohols, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 1487-1492.

⁵³ K.Z. Łączkowski, M. Zaidlewicz, A. Kmiecik, Nowe terpenowe β -aminoalkohole i sposób ich wytwarzania. Patent nr 215988 B1, C07C 215/44, C07C 213/00, data udzielenia patentu: 28.02.2014

⁵⁴ K.Z. Łączkowski, Ż. Czyżnikowska, R. Zaleśny, A. Baranowska-Łączkowska, The B-H-B bridging interaction in B-substituted oxazaborolidine-borane complexes: a theoretical study, *Struct. Chem.* **2013**, 24, 1485-1492.

⁵⁵ E.J. Corey, M. Azimioara, S. Sarshar, X-Ray crystal structure of a chiral oxazaborolidine catalyst for enantioselective carbonyl reduction, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3429-3430,

⁵⁶ D.J. Mathre, A.S. Thompson, A.W. Douglas, K.Hoogsteen, J.D. Carroll, E.G. Corley, E.J.J. Grabowski, A practical process for the preparation of tetrahydro-1-metyl-3,3-diphenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*][1,3,2]-oxazaborole-borane. A highly enantioselective stoichiometric and catalytic reducing agent. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2880-2888.

stosowany jako katalizator w enancjoselektywnej redukcji ketonów, imin, oksymów oraz asymetrycznym hydroborowaniu⁵⁷.

Jednym z najtrudniejszych etapów w asymetrycznej syntezie jest wyznaczenie konfiguracji absolutnej otrzymanych produktów. Konfigurację absolutną wyznacza się najczęściej za pomocą metod rentgenografii strukturalnej bądź poprzez korelację chemiczną. Pierwsza metoda wymaga otrzymania monokryształu badanego związku, co jest zadaniem nietrywialnym, gdyż często otrzymuje się bezpostaciowy produkt. Druga metoda wymaga przeprowadzenia szeregu czasochłonnych reakcji, co w przypadku określenia konfiguracji absolutnej produktów naturalnych jest procesem niezwykle żmudnym. Na pomoc przychodzą nam tutaj metody mechaniki kwantowej. Przeprowadzenie obliczeń skręcalności właściwej dla jednego enancjomeru i porównanie go z danymi eksperymentalnymi pozwala określić, który enancjomer znajduje się w próbce. W moich pierwszych badaniach dotyczących tego zagadnienia udało mi się poprawnie przewidzieć stosując metody mechaniki kwantowej znaki skręcalności właściwej dla trzech badanych aminoalkoholi pochodnych karenu, które charakteryzowały się wysoką elastycznością konformacyjną⁵⁸. Brałem też udział w badaniach nad wykorzystaniem baz polaryzacyjnych LPol do obliczeń skręcalności właściwej grupy związków, w przypadku których wiele badaczy na świecie zdiagnozowało trudności w prawidłowym określeniu znaku ich skręcalności właściwej⁵⁹. Uczestniczyłem również w przeprowadzeniu obliczeń liniowych i nieliniowych właściwości indukowanych promieniowaniem w przybliżeniu DFT/B3LYP w bazach polaryzacyjnych LPol w testowych układach achiralnych (Ne, N₂, CO)⁶⁰. W pracy tej udało nam się wskazać bazy pozwalające na redukcję kosztu obliczeń tych wielkości przy zachowaniu dużej dokładności wyników. Oznacza to możliwość prowadzenia dokładnych obliczeń wielkości tego typu także w układach większych rozmiarów. Interesujące wyniki uzyskano również w ramach pracy⁶¹. Proponowana tam baza funkcyjna określana symbolem ORP charakteryzowała się niewielkim rozmiarem, czas obliczeń był niewielki, a uzyskane wyniki były jakościowo porównywalne do uzyskiwanych za pomocą dużej bazy aug-cc-pVTZ. Ze względu na to, że baza ORP dawała wysokiej jakości wyniki, została ona polecona do rutynowych obliczeń skręcalności właściwej związków organicznych prowadzonych w przybliżeniu DFT. Jednym

⁵⁷ M. Zaidlewicz, M.P. Krzemiński, K. Łączkowski, Tetrahydro-1-methyl-3,3-diphenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*][1,3,2]oxazaborole, (First update, **2007**) *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* [Online], New York, John Wiley & Sons, DOI: 10.1002/047084289X.rn00701, <http://www.mrw.interscience.wiley.com/eros>

⁵⁸ K.Z. Łączkowski, A. Baranowska, Conformational analysis and optical rotation of carene β-amino alcohols. A DFT study, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2009, 4600-4605.

⁵⁹ A. Baranowska, K.Z. Łączkowski, A.J. Sadlej, Model studies of the optical rotation and theoretical determination of its sign for β-pinene and *trans*-pinane, *J. Comput. Chem.*, **2010**, 31, 1176-1181.

⁶⁰ A. Baranowska-Łączkowska, K.Z. Łączkowski, B. Fernández, Accurate calculation of the intensity dependence of the refractive index using polarized basis sets, *J. Chem. Phys.*, **2012**, 136, 024302-1-12.

⁶¹ A. Baranowska-Łączkowska, K.Z. Łączkowski, The ORP basis set designed for optical rotation calculation, *J. Comput. Chem.* **2013**, 34, 2006-2013.

z czynników wpływających na uzyskanie prawidłowego znaku skręcalności właściwej jest znalezienie najbardziej trwałych konformerów danego związku i ich optymalizacja za pomocą wybranej metody i odpowiednich baz funkcyjnych. W większości przypadków generowanie odpowiednich konformerów jest procesem intuicyjnym. W ramach współpracy nawiązanej ostatnio z prof. Christianem Henriksenem została opracowana matematyczna metoda racjonalnego generowania konformerów związków organicznych a następnie przetestowana na konformacyjnie elastycznych cząsteczkach, m.in. morfinie, amfetaminie, asparaginie oraz ostatnio zsyntetyzowanych 1-azydoalkoholach⁶².

Jednym z najbardziej rozwijających okresów w mojej karierze naukowej był pobyt na stażu postdoktorskim w grupie prof. Enrique Guitiána na Uniwersytecie Santiago de Compostela w Hiszpanii. Tam też badając reakcję trimeryzacji arynów wobec katalizatorów palladowych wyizolowałem produkt, którego struktura nie była zgodna z ogólnie przyjętym mechanizmem reakcji. Po dokonaniu odpowiednich analiz stwierdziłem, że zachodzi tutaj nieznaną do tej pory w literaturze wysoce selektywna insercja arynów do wiązania sigma w ugrupowaniu C(sp)–O(sp³). W toku dalszych badań zoptymalizowałem warunki reakcji, tak aby reakcja zachodziła z wysoką wydajnością. Za pomocą mechaniki kwantowej zaproponowano również prawdopodobny mechanizm nowo poznanej reakcji⁶³.

Po powrocie ze stażu zagranicznego podjąłem badania nad hydrazynyloazolami i ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową. Część tych badań wchodzi w skład cyklu stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Ponadto badania nad tetrahydroindazolotiazolami wykazały, że pochodna zawierająca podstawnik difenylomocznikowy wykazuje wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. epidermidis* ATCC 12228 (MIC 7,81 µg/ml) oraz dobrą aktywność wobec *S. aureus* ATCC 6538 (MIC 31,25 µg/ml). Związki zawierające podstawniki 4-nitrofenylowy, 4-fluorofenylowy, 4-cyjanofenylowy, 4-metoksyfenylowy, 4-bromofenylowy oraz benzoksazolinowy wykazały dobrą aktywność przeciwgrzybiczą (MIC 31,25-250 µg/ml)⁶⁴.

W ostatnich latach wykazano związek między infekcjami centralnego układu nerwowego a chorobami neurologicznymi. Stwierdzono, że infekcje bakteryjne (bakteryjne zapalenie opon mózgowych, gruźlica), wirusowe (HSV, HHV-6), grzybicze (kandydoza, kokcydiodomikoza) oraz pasożytnicze (toksoplazmoza mózgowa, malaria) są głównymi czynnikami ryzyka związanymi z występowaniem padaczki. Wciąż u 30% chorych na

⁶² A. Baranowska-Łączkowska, K.Z. Łączkowski, Ch. Henriksen, B. Fernández, M. Kozak, S. Zielińska, New basis set for the prediction of specific rotation in flexible biological molecules., *RSC Adv.* **2016**, 6, 19897-19902.

⁶³ K.Z. Łączkowski, D. García, D. Peña, A. Cobas, D. Pérez, E. Guitián, Highly selective insertion of arynes into a C(sp)–O(sp³) σ bond, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 960-963.

⁶⁴ K.Z. Łączkowski, K. Misiura, A. Biernasiuk, A. Malm, Synthesis and antimicrobial activities of (4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indazol-2(3*H*)-yl)thiazole derivatives., *Lett. Drug Des. Discov.*, **2014**, 11, 960-967.

padaczkę brak jest skutecznego leczenia. Związane jest to w dużej mierze ze zjawiskiem uodporniania się na powszechnie stosowane leki. Dlatego też uważa się, że skuteczną metodą walki z epilepsją jest poszukiwanie nowych klas związków nie będących pochodnymi leków już istniejących^{65,66,67}.

Ostatnio stwierdzono, że pochodne tiazolu mogą wykazywać interesujące właściwości przeciwdrgawkowe⁶⁸. Dzięki współpracy z prof. Kingą Sałat z Katedry Farmakodynamiki UJ udało się przebadać trzynaście hydrazynylotiazoli pochodnych cyklopentanokarboksy-aldehydu. Okazało się, że pochodne zawierające podstawniki 4-fluorofenyłowy, 4-chlorofenyłowy, 4-bromofenyłowy, 4-trifluorometylofenyłowy, 4-metylofenyłowy oraz adamantyłowy wykazały wysoką aktywność przeciwdrgawkową w modelu drgawek wywołanych pentylenetetrazolem PTZ z (zmiana wartości mediany dawki skutecznej, $ED_{50} \leq 20\text{mg/kg}$), co jest siedmiokrotnie niższą dawką niż referencyjny lek Etosuksimid⁶⁹. Pochodne 4-fluorofenyłowa i 4-chlorofenyłowa w znaczący sposób opóźniały wystąpienie drgawek klonicznych oraz zmniejszały liczbę epizodów napadowych w teście PTZ. Dodatkowo żadna z badanych pochodnych nie powodowała utraty zdolności motorycznej myszy w teście obracającego się pręta, co jest bardzo ważne w wykorzystaniu ich w przyszłości jako leki przeciwdrgawkowe. Dalsze badania pokazały również, że hydrazynylotiazole i hydrazynyloselenazole pochodne dihydro-2*H*-thiopyran-4(3*H*)-onu zawierające podstawniki 4-fluorofenyłowy i 4-chlorofenyłowy wykazują wysoką aktywność przeciwdrgawkową w modelu PTZ. Dodatkowo hydrazynylotiazol zawierający podstawnik 4-fluorofenyłowy oraz hydrazynyloselenazol z podstawnikiem 4-chlorofenyłowym chroniły przed napadami w teście 6-Hz³⁵. Pochodne te mogą być nową grupą leków stosowanych w leczeniu epilepsji.

Stosując metody obliczeniowe mechaniki kwantowej przeprowadzono ostatnio obliczenia przesunięć NMR hydrazynylotiazoli zawierających układ cykloalkilowy³³. Ustalenie przesunięcia chemicznego dla każdego atomu wodoru w takim układzie bez zastosowania kosztownych metod spektroskopowych jest bardzo trudne. Obliczenia przeprowadzone za pomocą metody DFT/B3LYP/6-311++G** umożliwiły określenie przesunięcia chemicznego każdego atomu wodoru w badanych hydrazynylotiazolach. Brałem udział również w obliczeniach przesunięć chemicznych atomów wodoru w policyklicznych węglowodorach

⁶⁵ M.M. Blanco, J.G. Jr. dos Santos, P. Perez-Mendes, S.R. Kohek, C.F. Cavarsan, M. Hummel, C. Albuquerque, L.E. Mello, Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylenetetrazole and electroshock models. *Epilepsia* **2009**, 50, 824-831.

⁶⁶ W. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **2011**, 20, 359-368.

⁶⁷ W. Löscher, D. Schmidt, Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* **2011**, 52, 657-678.

⁶⁸ N. Siddiqui, W. Ahsan W. Triazole incorporated thiazoles as a new class of anticonvulsants: design, synthesis and in vivo screening. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1536-1543.

⁶⁹ K.Z. Łączkowski, K. Sałat, K. Misiura, A. Podkowa, N. Malikowska, Synthesis and anticonvulsant activities of novel 2-(cyclopentylmethylene)hydrazinyl-1,3-thiazoles in mouse models of seizures., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31, 1576-1582.

aromatycznych (PAH) dla których wysoka jakość przeprowadzonych obliczeń została również potwierdzona za pomocą wielowymiarowych widm NMR⁷⁰.

b) najbliższe plany naukowe

Przedmiotem moich zainteresowań nadal pozostaje tematyka aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwnowotworowej hydrazynylotiazoli. Jednym z problemów, które napotkałem podczas prowadzonych badań, był brak lub niewielka aktywność hydrazynylotiazoli wobec bakterii Gram-ujemnych. Dokładna analiza literatury, jak i wnioski z dotychczas przeprowadzonych badań, doprowadziły do opracowania szeregu hydrazynylotiazoli zawierających układ chinuklidynonu. Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wykazały szerokie spektrum działania otrzymanych pochodnych wobec wszystkich testowanych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Wykazano również, że pochodna zawierająca podstawnik 4-trifluorometylofenylowy charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwdrgawkową w testach MES, 6-Hz oraz napadach padaczkowych wywołanych pilokarpiną. Dodatkowo badana pochodna nie powodowała utraty zdolności motorycznej myszy w teście obracającego się pręta, co jest korzystne z punktu widzenia jego zastosowania jako lek przeciwdrgawkowy. Manuskrypt przedstawiający powyższe badania został obecnie zaakceptowany do publikacji⁷¹.

Topologiczny polarny obszar cząsteczki (TPSA) określa zdolność związków do przenikania przez barierę krew-mózg. Związki wykazujące działanie w obrębie OUN nie powinny być bardziej polarne niż $TPSA \leq 50 \text{ \AA}^2$ ⁷². Obecnie trwają syntezy hydrazynylotiazoli pochodnych cyklopropanokarboksyaldehydu, gdyż obliczony TPSA dla tych połączeń wynosi około $40 \text{ \AA}^2$ co potwierdza ich potencjalne wysokie działanie przeciwdrgawkowe.

W ostatnim czasie zacząłem poszukiwać hydrazynylotiazole o wysokim działaniu przeciwnowotworowym, ale niezawierające grupy iperytowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że pochodne triazyn znakomicie spełniają tę rolę, gdyż otrzymałem serię związków o jeszcze wyższej aktywności przeciwnowotworowej i jeszcze mniejszej toksyczności niż wcześniej otrzymane iperyty azotowe. Przeprowadzone symulacje oddziaływań ligand-enzym pozwoliły wytypować hDNA topoll α jako potencjalny cel determinujący aktywność

⁷⁰ A. Baranowska-Łączkowska, K.Z. Łączkowski, B. Fernández, M. Vilas-Varela, S. Collazos, Theoretical evaluation of NMR shifts in polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mol. Phys.* **2017**, DOI:10.1080/00268976.2016.1275858.

⁷¹ K.Z. Łączkowski, K. Landowska, A. Biernasiuk, K. Sałat, A. Furgała, T. Plech, A. Malm, Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel quinuclidinone derivatives as potential antimicrobial and anticonvulsant agents. *Med. Chem. Res.* **2017**, DOI: 10.1007/s00044-017-1904-z.

⁷² M. Gierach, J. Gierach, M. Pujanek, A. Skowroń, E. Rutkowska, R. Junik, Aberrations in carbohydrate metabolism in patients with diagnosed acromegaly, hospitalized in the Endocrinology and Diabetology Department of Collegium Medicum University of Nicolaus Copernicus in Bydgoszcz in the years 2001-2009. *Endokrynol. Pol.* **2010**, 61, 260-263.

przeciwnowotworową. Dodatkowe badania wykonane za pomocą spektroskopii UV-VIS wykazały, że otrzymane związki silnie oddziałują z calf thymus DNA.

Obecnie podjąłem współpracę z dr hab. Katarzyną Dzitko prof. UŁ z Zakładu Immunoparazytologii Uniwersytetu Łódzkiego. Naszym wspólnym celem jest poszukiwanie nowych chemioterapeutyków pochodnych hydrazynyliotiazoli zwalczających toksoplazmozę, która jest pasożytniczą chorobą odzwierzęcą wywoływaną pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*. Do zwalczania toksoplazmozy stosuje się leczenie skojarzone polegające na podawaniu pirymetaminy (inhibitora reduktazy dihydrofolianowej) oraz sulfadiazyny. Jednak poważne skutki uboczne podczas stosowania tego leczenia skłania do poszukiwania nowych leków o mniejszej toksyczności dla organizmu człowieka. Badania hydrazynyliotiazoli pochodnych triazyn wykazały ich wysoką aktywność antypierwotniakową, co w połączeniu z bardzo małą toksycznością tych związków daje możliwość generowania nowych grup leków nie znanych do tej pory w literaturze. Przeprowadzone również i w tym przypadku symulacje oddziaływań ligand-enzym nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaki jest potencjalny cel determinujący aktywność przeciwpierwotniakową. Prawdopodobnie jest nią fosforylaza nukleozydów purynowych, bądź związki te oddziałują bezpośrednio z podwójną helisą DNA, na co wskazują badania spektroskopowe. Manuskrypt opisujący powyższe badania jest obecnie w przygotowaniu.

W najbliższym czasie planuję syntezę hydrazynyliotiazoli pochodnych aldehydów o długich łańcuchach alkilowych celem sprawdzenia wpływu długości łańcucha alkilowego na aktywność przeciwwgrzybiczą, przeciwbakteryjną oraz przeciwdrgawkową w różnych modelach padaczki. Planuję również rozszerzyć badania przeciwnowotworowe nowej serii triazyn na większy panel linii komórek nowotworowych oraz potwierdzić ich aktywność wobec wybranych celów molekularnych na drodze analiz enzymatycznych. Planuję także dalsze badania nad hydrazynyliotiazolami o szerokim spektrum działania, szczególnie wobec bakterii Gram-ujemnych.

Reaktywne formy tlenu powstające w organizmie powodują oksydacyjne uszkodzenia komórek, choroby degeneracyjne oraz przyczyniają się do powstawania nowotworów. Przeciwdziałają temu naturalne antyoksydanty takie jak kwas askorbinowy czy witamina E. Znane są również syntetyczne antyoksydanty, takie jak butylowany hydroksytoluen (BHT) i butylowany hydroksyanizol (BHA), jednak za względu na poważne skutki uboczne stosowanie ich jest zabronione. Pilotażowe badania nad antyoksydacyjnymi właściwościami hydrazynyliotiazoli i hydrazynyloselenazoli wykazały nawet kilkunastokrotnie wyższą aktywność antyoksydacyjną badanych związków niż BHA. Chcę również zbadać czy istnieje korelacja między właściwościami antyoksydacyjnymi hydrazynyloazoli a ich aktywnością przeciwnowotworową.

Krzysztof Łączkowski