



**Wydział  
Chemiczny**

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

**Złącznik nr 4**

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

**Autoreferat w języku polskim**

**Synteza aktywnych biologicznie pochodnych azotowych  
związków heterocyklicznych**

**dr inż. Edyta Sylwia Łukowska-Chojnacka**

**1. Imię i nazwisko**

**Edyta Sylwia Łukowska-Chojnacka**

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

**Magister inżynier**

15.07.2003, Warszawa, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Kierunek studiów: Biotechnologia

Tytuł pracy magisterskiej: *Próby enzymatycznego rozdziału mieszanin racemicznych tiocyjanohydryn*

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Pleniewicz

**Doktor nauk chemicznych**

19.02.2008, Warszawa, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Otrzymywanie optycznie czynnych  $\beta$ -hydroksytiocyjanianów z zastosowaniem katalizy enzymatycznej i ich przekształcanie w tiryany*

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Pleniewicz

Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

**01.09.2008-30.06.2010** - 0,9 etatu - adiunkt, Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

**01.09.2010-aktualnie** - adiunkt mianowany - Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (2010-2017 Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych), Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

(od 01.12.2011 dodatkowo Pełnomocnik Dziekana ds. programów międzynarodowych)

#### **4. 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. 2017 r. poz. 1789).**

##### **4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

Osiągnięciem naukowym w rozumieniu art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku jest jednotematyczny cykl 11 publikacji z bazy Journal Citation Reports (JCR) zatytułowany:

**„*Synteza aktywnych biologicznie pochodnych azotowych związków heterocyklicznych*”.**

Wybrane artykuły [H1]-[H11] opublikowano w latach 2012-2019. Ich łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania (z wyjątkiem prac opublikowanych w 2018 i 2019 roku, dla których podano IF z roku 2017) wynosi 27,735, a sumaryczna liczba punktów MNiSzW wynosi 290. W 9 artykułach jestem autorem korespondencyjnym.

##### **4.2 Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

###### Objaśnienia:

✉ - autor korespondencyjny

[H1]-[H11] - oznaczenie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

IF - impact factor

CI<sub>WoS</sub> - ilość cytowań wg bazy Web of Science (bez autocytowań)

CI<sub>Scopus</sub> - ilość cytowań wg bazy Scopus (bez autocytowań)

[H1]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> U. Bernaś, J. Plenkiewicz, 2012, Lipase-catalyzed enantioseparation of alcohols containing a tetrazole ring. *Tetrahedron: Asymmetry* 23, 136-143.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji badań, syntezie pochodnych tetrazolowych zawierających podstawnik fenyłowy, 4-chlorofenyłowy oraz 2-chlorofenyłowy, opracowaniu warunków enzymatycznego rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi, określeniu konfiguracji absolutnej otrzymanych optycznie czynnych związków, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

IF<sub>2012</sub>= 2,115; CI<sub>WoS</sub>= 1; CI<sub>Scopus</sub>= 2; MNiSzW= 30

[H2]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> J. Mierzejewska, 2014, Enzymatic hydrolysis of esters containing a tetrazole ring. *Chirality* 26, 811-816.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie i oczyszczeniu związków, opracowaniu warunków enzymatycznego kinetycznego rozdzielania mieszanin racemicznych estrów z ugrupowaniem tetrazolowym, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

IF<sub>2014</sub>= 1,886; CI<sub>WoS</sub>= 0; CI<sub>Scopus</sub>= 1; MNiSzW= 25

[H3]. M. Bondaryk, E. Łukowska-Chojnacka, M. Staniszevska,<sup>✉</sup> 2015, Tetrazole activity against *Candida albicans*. The role of KEX2 mutations in the sensitivity to (±)-1-[5-(2-chlorophenyl)-2H-tetrazol-2-yl]propan-2-yl acetate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2657-2663.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji badań, syntezie związków, uczestniczeniu w interpretacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowywaniu ostatecznej wersji manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

IF<sub>2015</sub>= 2,486; CI<sub>WoS</sub>= 9; CI<sub>Scopus</sub>= 9; MNiSzW= 25

[H4]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> M. Bretner, 2015, Synthesis of 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* 52, 841-845.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie, oczyszczeniu oraz scharakteryzowaniu badanych związków, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 90%.*

IF<sub>2015</sub>= 0,685; CI<sub>WoS</sub>= 0; CI<sub>Scopus</sub>= 0; MNiSzW= 20


[H5]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> M. Staniszevska, M. Bondaryk, J.K Maurin, M. Bretner, 2016, Lipase-catalyzed kinetic resolution of novel antifungal *N*-substituted benzimidazole derivatives. *Chirality* 28, 347-354.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie oraz oczyszczeniu badanych związków, zoptymalizowaniu warunków enzymatycznego kinetycznego rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi, opracowaniu wyników,*

*przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 75%.*


IF<sub>2016</sub>= 1,956; CI<sub>WoS</sub>=2; CI<sub>Scopus</sub>=4; MNiSzW= 20

[H6]. E. Łukowska-Chojnacka,  P. Wińska, M. Wielechowska, M. Bretner, 2016, Synthesis of polybrominated benzimidazole and benzotriazole derivatives containing a tetrazole ring and their cytotoxic activity. *Monatsh. Chem.* 147, 1789-1796.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie, oczyszczeniu oraz scharakteryzowaniu badanych związków, interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*


IF<sub>2016</sub>= 1,282; CI<sub>WoS</sub>=2; CI<sub>Scopus</sub>=3; MNiSzW= 20

[H7]. E. Łukowska-Chojnacka,  P. Wińska, M. Wielechowska, M. Poprzeczko, M. Bretner, 2016, Synthesis of novel polybrominated benzimidazole derivatives - potential CK2 inhibitors with anticancer and proapoptotic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 735-741.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie, oczyszczeniu oraz scharakteryzowaniu badanych związków, przygotowaniu wstępnej wersji tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem*

*Mój udział procentowy szacuję na 55%.*


IF<sub>2016</sub>= 2,930; CI<sub>WoS</sub>=9; CI<sub>Scopus</sub>=11; MNiSzW= 25

[H8]. E. Łukowska-Chojnacka,  J. Mierzejewska, M. Milner-Krawczyk, M. Bondaryk, M. Staniszevska, 2016, Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 6058-6065.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, syntezie, oczyszczeniu oraz scharakteryzowaniu badanych związków, przygotowaniu wstępnej wersji tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

IF<sub>2016</sub>= 2,930; CI<sub>WoS</sub>=9; CI<sub>Scopus</sub>=12; MNiSzW= 25

[H9]. M. Staniszevska,  M. Gizińska, E. Mikulak, K. Adamus, M. Koronkiewicz, E. Łukowska-Chojnacka, 2018, New 1,5 and 2,5-disubstituted tetrazoles - dependent activity towards surface barrier of *Candida albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* 145, 124-139.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań chemicznych i współtworzeniu koncepcji badań biologicznych, przygotowaniu planu eksperymentów w części chemicznej, syntezie i oczyszczeniu większości związków, współuczestniczeniu w przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz współudziale w przygotowywaniu odpowiedzi na pytania recenzentów.*

*Mój udział procentowy szacuję na 45%.*

IF<sub>2017</sub>= 4,816; CI<sub>WoS</sub>=3; CI<sub>Scopus</sub>=2; MNiSzW= 40

[H10]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> A. Kowalkowska, A. Napiórkowska, 2018, Lipase-catalyzed kinetic resolution of novel antitubercular benzoxazole derivatives. *Chirality* 30, 457-468.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, syntezie ketonów, alkoholi oraz estrów z ugrupowaniem benzoksazolu, opracowaniu warunków kinetycznego rozdzielania otrzymanych mieszanin racemicznych alkoholi i estrów, opracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

IF<sub>2017</sub>= 1,833; CI<sub>WoS</sub>=0; CI<sub>Scopus</sub>=0; MNiSzW= 20

[H11]. E. Łukowska-Chojnacka,<sup>✉</sup> A. Kowalkowska, M. Gizińska, M. Koronkiewicz, M. Staniszevska, 2019, Synthesis of tetrazole derivatives bearing pyrrolidine scaffold and evaluation of their antifungal activity against *Candida albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* 164, 106-120.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań chemicznych i współtworzeniu koncepcji badań biologicznych, syntezie i oczyszczeniu większości związków, przygotowaniu części manuskryptu, redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.*

*Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

IF<sub>2017</sub>= 4,816; CI<sub>WoS</sub>=0; CI<sub>Scopus</sub>=1; MNiSzW= 40

## Tabelaryczne zestawienie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Symbol i dane bibliometryczne artykułu	Udział własny (%)	IF*	Punktacja MNiSzW	CI <sub>WoS</sub>	CI <sub>Scopus</sub>
[H1]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> U. Bernaś, J. Plenkiewicz, 2012, Lipase-catalyzed enantio-separation of alcohols containing a tetrazole ring. <i>Tetrahedron: Asymmetry</i> 23, 136-143.	70	2,115	30	1	2
[H2]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> J. Mierzejewska, 2014, Enzymatic hydrolysis of esters containing a tetrazole ring. <i>Chirality</i> 26, 811-816.	80	1,886	25	0	1
[H3]. M. Bondaryk, E. Łukowska-Chojnacka, M. Staniszewska, <sup>✉</sup> 2015, Tetrazole activity against <i>Candida albicans</i> . The role of KEX2 mutations in the sensitivity to (±)-1-[5-(2-chlorophenyl)-2H-tetrazol-2-yl]propan-2-yl acetate. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 25, 2657-2663.	30	2,486	25	9	9
[H4]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> M. Bretner, 2015, Synthesis of 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole derivatives. <i>J. Heterocycl. Chem.</i> 52, 841-845.	90	0,685	20	0	0
[H5]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> M. Staniszewska, M. Bondaryk, J.K Maurin, M. Bretner, 2016, Lipase-catalyzed kinetic resolution of novel antifungal N-substituted benzimidazole derivatives. <i>Chirality</i> 28, 347-354.	75	1,956	20	2	4
[H6]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> P. Wińska, M. Wielechowska, M. Bretner, 2016, Synthesis of polybrominated benzimidazole and benzotriazole derivatives containing a tetrazole ring and their cytotoxic activity. <i>Monatsh. Chem.</i> 147, 1789-1796.	70	1,282	20	2	3
[H7]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> P. Wińska, M. Wielechowska, M. Poprzeczko, M. Bretner, 2016, Synthesis of novel polybrominated benzimidazole derivatives - potential CK2 inhibitors with anticancer and proapoptotic activity. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 24, 735-741.	55	2,930	25	9	11

**Tabelaryczne zestawienie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego cd.**

<b>Symbol i dane bibliometryczne artykułu</b>	<b>Udział własny (%)</b>	<b>IF*</b>	<b>Punktacja MNiSzW</b>	<b>CIWoS</b>	<b>CIscopus</b>
[H8]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> J. Mierzejewska, M. Milner-Krawczyk, M. Bondaryk, M. Staniszewska, 2016, Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 24, 6058-6065.	60	2,930	25	9	12
[H9]. M. Staniszewska, <sup>✉</sup> M. Gizińska, E. Mikulak, K. Adamus, M. Koronkiewicz, E. Łukowska-Chojnacka, 2018, New 1,5 and 2,5-disubstituted tetrazoles - dependent activity towards surface barrier of <i>Candida albicans</i> . <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 145, 124-139.	45	4,816	40	3	2
[H10]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> A. Kowalkowska, A. Napiórkowska, 2018, Lipase-catalyzed kinetic resolution of novel antitubercular benzoxazole derivatives. <i>Chirality</i> 30, 457-468.	70	1,833	20	0	0
[H11]. E. Łukowska-Chojnacka, <sup>✉</sup> A. Kowalkowska, M. Gizińska, M. Koronkiewicz, M. Staniszewska, 2019, Synthesis of tetrazole derivatives bearing pyrrolidine scaffold and evaluation of their antifungal activity against <i>Candida albicans</i> . <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 164, 106-120.	50	4,816	40	0	1
<b>SUMA</b>		<b>27,735</b>	<b>290</b>	<b>35</b>	<b>45</b>

\*Impact Factor (IF) podano zgodnie z rokiem opublikowania według listy Journal Citation Reports z wyjątkiem prac opublikowanych w 2018 i 2019 roku, dla których podano IF z roku 2017 (ostatni dostępny).

Wszystkie szczegóły dotyczące sposobu prowadzenia badań oraz otrzymanych wyników zawarte są w załączonych artykułach. Przedstawiona kompilacja stanowi ich zwarte omówienie. Kolejność omawiania otrzymanych wyników nie jest zgodna z kolejnością ich opublikowania.



### 4.3 Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Związki zawierające pierścień heterocykliczny z atomem (atomami) azotu odgrywają ważną rolę zarówno pod względem chemicznym jak i biologicznym. Znajdujące one zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu oraz są szeroko wykorzystywane w syntezie organicznej. Szczególną uwagę zwraca ich potencjał farmakologiczny, przez co stosowane są jako substancje czynne leków. Wśród farmaceutyków zatwierdzonych przez Agencję Żywności i Leków (ang. U.S. FDA) aż 59% preparatów leczniczych zawiera w swojej strukturze przynajmniej jeden pierścień heterocykliczny z atomem (atomami) azotu.<sup>1</sup> Dominują pierścienie nasycone typu piperydyna, piperazyna, azetydyn-2-on i piroolidyna oraz aromatyczne takie jak pirydyna, tiazol, imidazol, indol czy tetrazol.<sup>1</sup> Układy te występują pojedynczo lub grupowo (Rysunek 1) m.in. w lekach o działaniu przeciwhistaminowym (np. astemizol), antyhipertensyjnym (np. kandesartan), przeciw pasożytniczym (np. nitazoksanid), przeciwwirusowym (np. delawirdyna), przeciwgrzybiczym (np. ketokonazol), przeciwbakteryjnym (np. cefazolina, izoniazyd), przeciwpsychotycznym (np. asenapina) oraz przeciwnowotworowym (np. dasatynib).<sup>1</sup> Potwierdzone działanie terapeutyczne struktur zawierających pierścień heterocykliczny z jednym lub kilkoma atomami azotu sprawia, że w tej grupie związków poszukuje się nowych substancji czynnych leków. Przedstawiony przeze mnie cykl prac wpisuje się w ten trend. W związku ze wzrastającą na świecie liczbą infekcji grzybiczych oraz bakteryjnych podjęłam badania nad syntezą nowych związków wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe.<sup>2,3</sup> Czynnikiem determinującym potrzebę syntezy tego typu preparatów jest wzrost oporności mikroorganizmów na stosowane leki.<sup>4,5</sup> Przykładem mogą być odporne na azole szczepy *Candida* spp.,<sup>4</sup> odporne na cefalosporyny III generacji szczepy *Klebsiella pneumoniae*,<sup>3</sup> odporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus*<sup>3</sup> oraz odporne na izoniazyd i rifampicynę szczepy *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>3</sup>

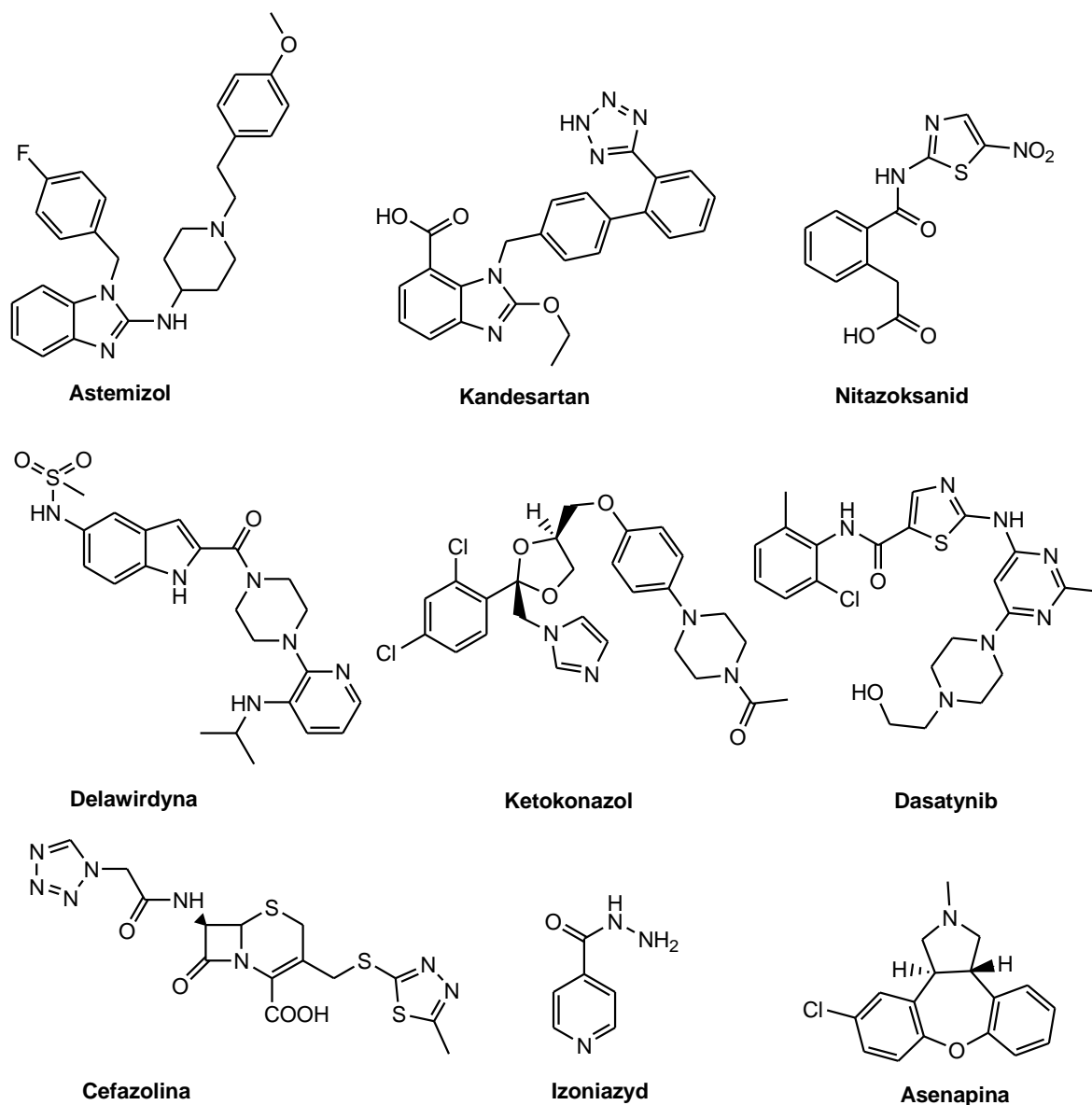
<sup>1</sup> E. Vitaku, D.T. Smith, J.T. Njardarson, 2014, Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* 57, 10257-10274.

<sup>2</sup> F. Bongomin, S. Gago, R.O. Oladele, D.W. Denning, 2017, Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi* 3, 57.

<sup>3</sup> N. Woodford, D.M. Livermore, 2009, Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J. Infect.* 59, S4-S16.

<sup>4</sup> D. Sanglard, 2002, Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 379-385.

<sup>5</sup> F. Prestinaci, P. Pezzotti, A. Pantosti, 2015, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health* 109, 309-318.



**Rysunek 1.** Przykłady farmaceutyków z azotowym ugrupowaniem heterocyklicznym.

Prowadzone przeze mnie badania ukierunkowane były także na syntezę nowych związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe. Nowotwory złośliwe podobnie jak zakażenia mikrobiologiczne stanowią globalny problem.<sup>6</sup> Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2018 roku z powodu chorób nowotworowych zmarło 9,6 miliona osób,<sup>7</sup> w tym 25% stanowili Europejczycy.<sup>8</sup> Do najczęstszych nowotworów

<sup>6</sup> L.T. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal, 2016, Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25, 16-27.

<sup>7</sup> <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

<sup>8</sup> J. Ferlaya, M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser, F. Bray, 2018, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur. J. Cancer.* 103, 356-387.

złośliwych należą rak płuc, jelita grubego, żołądka, piersi u kobiet oraz gruczołu krokowego u mężczyzn. Pomimo stosowania innowacyjnych terapii śmiertelność z powodu chorób nowotworowych nie spada, a prognozy wskazują, że będzie systematycznie wzrastać. W związku z tym konieczne jest prowadzenie badań nad syntezą nowych, skutecznych farmaceutyków onkologicznych.

Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego pt. „Synteza aktywnych biologicznie pochodnych azotowych związków heterocyklicznych”, było otrzymanie nowych pochodnych tetrazolu wykazujących aktywność przeciwgrzybiczą, benzimidazolu i benzotriazolu charakteryzujących się działaniem przeciwnowotworowym oraz benzoksazolu o potencjalnej aktywności antymykobakteryjnej. Celem moich badań było także określenie zależności między strukturą związku a jego aktywnością biologiczną oraz wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków do dalszych badań biologicznych. Mając na uwadze współzależność między konfiguracją absolutną związku a jego aktywnością biologiczną, za cel badawczy postawiłam sobie także opracowanie warunków enzymatycznego kinetycznego rozdzielania otrzymanych w postaci mieszanin racemicznych nowych pochodnych tetrazolu, benzimidazolu oraz benzoksazolu. Swoją uwagę skoncentrowałam także na syntezie związków zawierających dwa pierścienie heterocykliczne. Należą do nich nowe, nieopisane wcześniej pochodne tetrazolu z ugrupowaniem morfoliny, pirolidyny, benzoksazolu, benzotiazolu, benzimidazolu lub benzotriazolu oraz nowe pochodne benzimidazolu z ugrupowaniem morfoliny, piperazyny lub pirolidyny. Funkcjonalizacja wymienionych azoli kolejnymi podstawnikami heterocyklicznymi w zamierzeniu miała doprowadzić do otrzymania nowych, bardziej aktywnych związków.

### **Synteza i ocena aktywności przeciwgrzybiczej pochodnych tetrazolu**

Pierwszą grupą syntetyzowanych przeze mnie związków były pochodne tetrazolu. Spostrzeżenie, że 5-podstawiony pierścień tetrazolowy jest bioizosterem grupy karboksylowej, a otrzymane analogi tetrazolowe wykazują wyższą trwałość metaboliczną oraz łatwiej przenikają przez błony komórkowe, skutkowało wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny antagonistów receptora AT<sub>1</sub> angiotensyny II takich jak losartan,

kandesartan, irbesartan, walsartan czy olmesartan.<sup>9,10</sup> Pierścień tetrazolowy występuje także w kardiazolu,<sup>11</sup> antybiotykach,<sup>11,12</sup> preparatach przeciwalergicznym,<sup>13</sup> przeciwbólowych<sup>14</sup> oraz związkach o działaniu przeciwzapalnym,<sup>15</sup> przeciwbakteryjnym<sup>15</sup> i przeciwgrzybiczym.<sup>15</sup> To właśnie potencjał przeciwgrzybiczy pochodnych tetrazolowych zwrócił moją uwagę oraz skłonił do badań nad syntezą nowych, potencjalnych antimikotyków. Interesujący wydał mi się również fakt, że w literaturze nie było informacji na temat syntezy optycznie czynnych pochodnych tetrazolu z wykorzystaniem katalizy enzymatycznej. Wiadomo natomiast było, że pierścień tetrazolowy może wpływać dodatnio na aktywność enzymów, czego przykładem są tetrazolowe analogi aminokwasów zwiększające aktywność karboksylopeptydazy A<sup>16</sup> lub hamująco, co potwierdzają badania nad tetrazolowymi inhibitorami takich enzymów jak glikozydaza wątrobowa,<sup>17</sup>  $\alpha$ -mannozydaza wątrobowa,<sup>18</sup> czy cyklooksygenaza-2.<sup>19</sup> Kierując się tą wiedzą zaprojektowałam chemoenzymatyczną syntezę optycznie czynnych alkoholi oraz estrów z podstawnikiem tetrazolowym. Badania te opisałam w publikacjach [H1] i [H2].

Etap chemiczny obejmował syntezę 5-arylotetrazoli, 5-arylotetrazolowych pochodnych butanonu i propanonu oraz odpowiadających im mieszanin racemicznych alkoholi i estrów. Przeprowadzone reakcje ilustruje Schemat 1. 5-Arylotetrazole **1a-d** otrzymałam zgodnie

<sup>9</sup> R.J. Herr, 2002, 5-Substituted-1*H*-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 3379-3393.

<sup>10</sup> V.B. Vangala, R.M. Hindupur, H.N. Pati, 2014, A review on synthesis of antihypertensive sartan drugs. *IJPRR* 3, 46-56.

<sup>11</sup> V.A. Ostrovskii, R.E. Trifonov, E.A. Popova, 2012, Medicinal chemistry of tetrazoles. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 61, 768-780.

<sup>12</sup> K. Tsuchiya, M. Kondo, M. Kida, M. Nakao, T. Iwahi, T. Nishi, Y. Noji, M. Takeuchi, Y. Nozaki, 1981, Cefmenoxime (SCE-1365), a novel broad-spectrum cephalosporin: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19, 56-65.

<sup>13</sup> Y. Yanagihara, H. Kasai, T. Kawashima, K. Ninomiya, 1989, Immunopharmacological studies on TBX, a new antiallergic drug (4) effects on Type II to IV allergic reactions and immunological functions in animal models. *Japan J. Pharmacol.* 15, 93-100.

<sup>14</sup> F. Janssens, J. Torremans, P.A.J. Janssen, 1986, Synthetic 1,4-disubstituted-1,4-dihydro-5*H*-tetrazol-5-one derivatives of fentanyl: Alfentanil (R 39209), a potent, extremely short-acting narcotic analgesic. *J. Med. Chem.* 29, 2290-2297.

<sup>15</sup> N. Kaushik, N. Kumar, A. Kumar, U.K. Singh, 2018, Tetrazoles: synthesis and biological activity. *Immun. Endoc. Metab. Agents Med. Chem.* 18, 3-21.

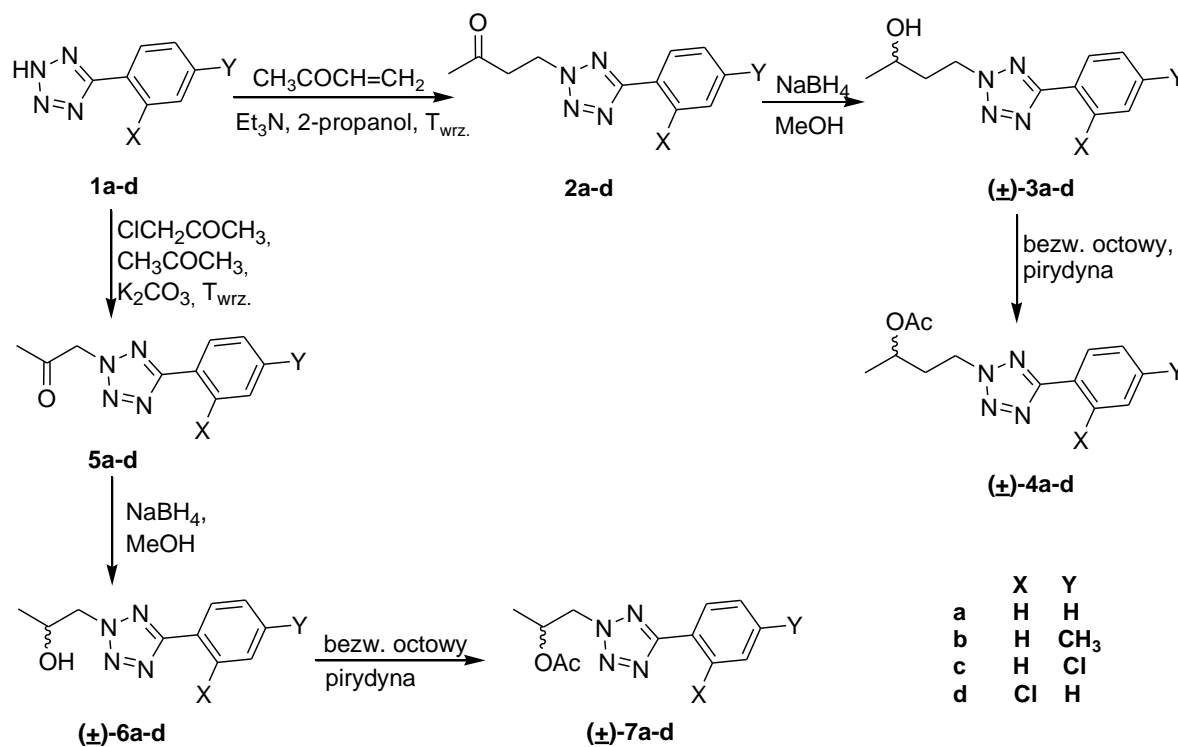
<sup>16</sup> E. Kojro, I. Willhardt, A. Römbach, Z. Grzonka, P. Hermann, 1987, Tetrazole analogs of amino acids as constituents of modifiers of carboxypeptidase A catalysis. *FEBS Lett.* 212, 83-86.

<sup>17</sup> T.W. Brandstetter, B. Davis, D. Hyett, C. Smith, L. Hackett, B.G. Winchester, G.W.J. Fleet, 1995, Tetrazoles of manno- and rhamno-pyranoses: inhibition of glycosidases by tetrazoles and other mannose mimics. *Tetrahedron Lett.* 36, 7511-7514.

<sup>18</sup> B.G. Davis, T.W. Brandstetter, L. Hackett, B.G. Winchester, R.J. Nash, A.A. Watson, R.C. Griffiths, C. Smith, G.W.J. Fleet, 1999, Tetrazoles of manno- and rhamno-pyranoses: contrasting inhibition of mannosidases by [4.3.0] but of rhamnosidase by [3.3.0] bicyclic tetrazoles. *Tetrahedron* 55, 4489-4500.

<sup>19</sup> B.J. Al-Hourani, S.K. Sharma, J.Y. Mane, J. Tuszyński, V. Baracos, T. Kniess, M. Suresh, J. Pietzsch, F. Wuest, 2011, Synthesis and evaluation of 1,5-diaryl-substituted tetrazoles as novel selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 1823-1826.

z procedurami literaturowymi.<sup>20</sup> Nieopisane wówczas w literaturze 4-(5-arylo-2*H*-tetrazol-2-ilo)butan-2-ony **2a-d** syntetyzowałam wykorzystując reakcje addycji Michaela, zaś 1-(5-arylo-2*H*-tetrazol-2-ilo)propan-2-ony **5a-d** otrzymałam w wyniku reakcji N-alkilowania. Produktami były wyłącznie 2,5-dwupodstawione tetrazole, co świadczy o regiospecyficznosci obu typów reakcji.



**Schemat 1.** Synteza mieszanin racemicznych alkoholi i estrów z ugrupowaniem tetrazolowym.

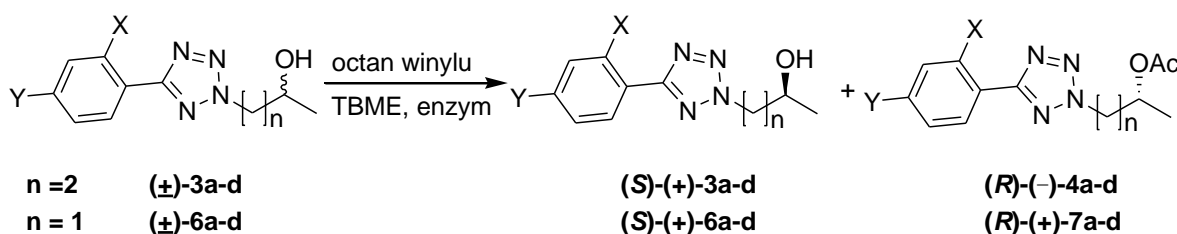
W zależności od charakteru i pozycji podstawnika w pierścieniu benzenowym 5-arylotetrazoli **1a-d** reakcje osiągały 100% konwersję po różnym czasie. W przypadku syntezy 4-(5-arylo-2*H*-tetrazol-2-ilo)-butan-2-onów **2a-d** wprowadzenie w pozycję *para* podstawnika elektronodonorowego (CH<sub>3</sub>) lub elektronoakceptorowego (Cl) skutkowało wydłużeniem czasu reakcji z 3 (brak podstawnika) do 4 (CH<sub>3</sub>) i 6 godzin (Cl). Obecność natomiast atomu chloru w pozycji *orto* nie miała wpływu na czas reakcji. W przypadku syntezy 1-(5-arylo-2*H*-tetrazol-2-ilo)propan-2-onów **5a-d** wydłużenie czasu reakcji następowało tylko podczas N-alkilowania 5-(4-metylofenylo)tetrazolu (**1b**), zaś reakcje

<sup>20</sup> W.G. Finnegan, R.A. Henry, R. Lofquist, 1958, An improved synthesis of 5-substituted tetrazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3908-3911.

z analogami podstawionymi atomem chloru zachodziły w takim samym czasie (Cl w pozycji *para*) lub krótszym (Cl w pozycji *orto*). Wszystkie ketony w wydajny i szybki sposób, w wyniku redukcji borowodorkiem sodu przekształcałam w mieszaniny racemiczne alkoholi ( $\pm$ )-**3a-d** oraz ( $\pm$ )-**6a-d**, a te z kolei w wyniku acetylowania bezwodnikiem octowym w octany ( $\pm$ )-**4a-d** i ( $\pm$ )-**7a-d**. Efektem przeprowadzonych eksperymentów była synteza i identyfikacja 24 nowych związków.

Przedmiotem moich dalszych badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania katalizy enzymatycznej do rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi ( $\pm$ )-**3a-d** i ( $\pm$ )-**6a-d** oraz estrów ( $\pm$ )-**4a-d** i ( $\pm$ )-**7a-d**. W badaniach tych wykorzystałam dwa typy katalizowanych lipazami biotransformacji: transestryfikację octanu winylu alkoholami ( $\pm$ )-**3a-d** i ( $\pm$ )-**6a-d** [**H1**] oraz hydrolizę estrów ( $\pm$ )-**4a-d** i ( $\pm$ )-**7a-d** [**H2**]. Warto wspomnieć, że reakcje biotransformacji cieszą się zainteresowaniem chemików od wielu lat. Stosowanie enzymów jako katalizatorów pozwala bowiem na uproszczenie wielu syntez poprzez zmniejszenie ilości ich etapów, prowadzenie reakcji w łagodnych warunkach oraz ograniczenie ilości produktów ubocznych. Największą zaletą enzymów jest jednak ich specyficzność substratowa, regio- oraz enancjoselektywność. Dzięki ostatniej z wymienionych cech można rozdzielić mieszaniny racemiczne związków na enancjomery, co jest niezwykle istotne w przypadku syntezy potencjalnych substancji czynnych leków.

W pracy [**H1**] opisałam badania nad optymalizacją warunków enzymatycznego kinetycznego rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi ( $\pm$ )-**3a-d** oraz ( $\pm$ )-**6a-d**. Modelową reakcją była katalizowana przez lipazy transestryfikacja octanu winylu wymienionymi alkoholami (Schemat 2). W badaniach tych wykorzystałam trzy komercyjnie dostępne lipazy: dwie natywne pochodzenia bakteryjnego (Amano AK z *Pseudomonas fluorescens* oraz Amano PS z *Pseudomonas cepacia* - aktualnie z *Burkholderia cepacia*) oraz immobilizowany Novozym SP 435 izolowany z grzybów (*Candida antarctica* frakcja-B).



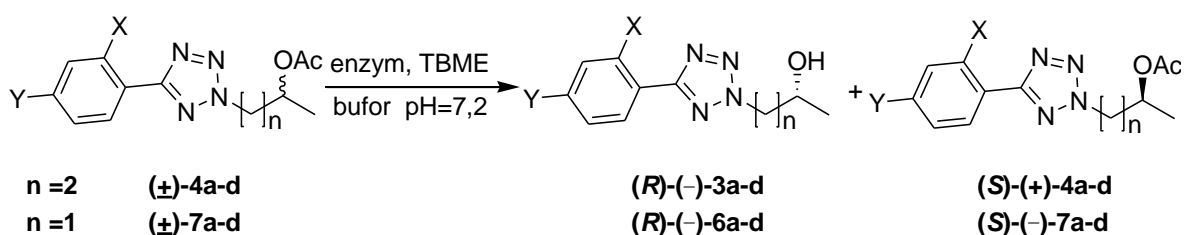
**Schemat 2.** Transestryfikacja enzymatyczna octanu winylu alkoholami z ugrupowaniem tetrazolowym.

Za pierwszy cel badawczy postawiłam sobie sprawdzenie wpływu budowy substratów (5-arylotetrazolowych pochodnych butan-2-olu ( $\pm$ )-**3a-d**) na selektywność wymienionych biokatalizatorów. Parametrami pozwalającymi określić efektywność przeprowadzonych eksperymentów były wyznaczone metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) czystości optyczne (nadmiary enancjomeryczne e.e.) otrzymanych chiralnych estrów i pozostających w mieszaninie nieprzereagowanych alkoholi oraz wyliczona na tej podstawie enancjoselektywność reakcji (E). Aby określić czystość optyczną estrów (*R*)-(-)-**4a-d** konieczne było przeprowadzenie dodatkowej reakcji, a mianowicie ich hydrolizy do alkoholi, gdyż stosowana kolumna z chiralnym wypełnieniem nie różnicowała enancjomerów tych estrów. Spośród testowanych enzymów najwyższą enancjoselektywnością charakteryzowała się lipaza Amano AK z *Pseudomonas fluorescens*. Nadmiary enancjomeryczne (e.e.) otrzymanych estrów wynosiły 80-96%, a alkoholi 59-98%. Obecność podstawnika w pierścieniu benzenowym substratów wpływała na enancjoselektywność reakcji (E), powodując jej spadek z wartości 102 (brak podstawnika) do 59 (*p*-CH<sub>3</sub>), 40 (*o*-Cl) i 38 (*p*-Cl). Dodatkowo wprowadzenie atomu chloru w pozycję *orto* skutkowało czterokrotnym wydłużeniem czasu, po którym reakcja osiągnęła konwersję 55%. Pozostałe enzymy okazały się mało selektywnymi bądź nieselektywnymi katalizatorami (E = 0-7), w związku z tym nie stosowałam ich w dalszych badaniach obejmujących reakcje mieszanin racemicznych pochodnych propan-2-olu ( $\pm$ )-**6a-d** z octanem winylu. Wymienione reakcje pozwoliły sprawdzić czy odległość między grupą hydroksylową a pierścieniem tetrazolowym wpływa na właściwości katalityczne lipazy Amano AK oraz enancjoselektywność reakcji. Na podstawie uzyskanych wyników wykazałam, że długość łańcucha alkilowego między grupą hydroksylową a pierścieniem tetrazolowym znacząco wpływa na szybkość reakcji. W przypadku alkoholu niepodstawionego ( $\pm$ )-**6a** oraz pochodnych *para*-postawionych ( $\pm$ )-**6b-c**, w porównaniu do ich analogów ( $\pm$ )-**3a-c**, nastąpiło prawie dwukrotne wydłużenie czasu reakcji, zaś w przypadku pochodnej z atomem chloru w pozycji *orto* reakcja osiągnęła konwersję 56% po dużo krótszym czasie. Skrócenie łańcucha alkilowego o jedną grupę metylenową nie miało natomiast znaczącego wpływu na enancjoselektywność reakcji (E w zakresie 36-41). Otrzymane optycznie czynne estry oraz alkohole z ugrupowaniem tetrazolowym były odpowiednio (*R*) i (*S*) enancjomerami. Konfigurację absolutną alkoholi określiłam metodą spektroskopii NMR z zastosowaniem chiralnego odczynnika derywatyzującego-

enancjomeru (*R*) oraz (*S*) kwasu  $\alpha$ -metoksyfenylooctowego (MPA).<sup>21</sup> Do syntezy diastereoizomerów wytypowałam dwa reprezentatywne chiralne alkohole: (–)-4-(5-fenyl-2*H*-tetrazol-2-ilo)butan-2-ol ((–)-**3a**, e.e.=96%) oraz (+)-1-(5-(2-chlorofenyl)-2*H*-tetrazol-2-ilo)-propan-2-ol ((+)-**6d**, e.e.=99%). Konfiguracja absolutna pozostałych alkoholi określona została na podstawie porównania kierunku skręcania płaszczyzny polaryzacji monochromatycznego światła spolaryzowanego przez te związki z alkoholami (–)-**3a** oraz (+)-**6d**.

Z praktycznego punktu widzenia opisane reakcje transestryfikacji zachodziły z zadawalającymi enancjoselektywnościami ( $E > 35$ ). Jednakże z mojego punktu widzenia jeszcze większym sukcesem byłoby zaprojektowanie reakcji, która niezależnie od podstawnika w ugrupowaniu 5-arylotetrazolowym zachodziłaby z enancjoselektywnością powyżej 100, w konsekwencji czego przerywając reakcję przy konwersji 50% otrzymalibyśmy parę enancjomerów. W związku z powyższym obiektem moich dalszych badań były reakcje hydrolizy enzymatycznej.

Badania nad opracowaniem warunków hydrolitycznego kinetycznego rozdzielania mieszanin racemicznych estrów z ugrupowaniem tetrazolowym opisałam w pracy [**H2**]. W badaniach tych wykorzystałam te same lipazy: Amano AK, Amano PS oraz Novozym SP 435. Uwzględniając fakt, że enzymy te wykazują najwyższą aktywność w układach dwufazowych reakcje hydrolizy prowadziłam w układzie eter *tert*-butylowo-metylowy (TBME)/bufor fosforanowy pH=7,2 (Schemat 3.). Dodatkową zaletą stosowania jako drugiej fazy rozpuszczalnika organicznego było wyeliminowanie problemu rozpuszczalności substratów w medium reakcyjnym.



**Schemat 3.** Hydroliza enzymatyczna estrów z ugrupowaniem tetrazolowym.

<sup>21</sup> J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, 2001, A practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 2915-2925.



Najbardziej selektywnym biokatalizatorem okazał się Novozym SP 435, który w opisanych wcześniej reakcjach transestryfikacji w zasadzie nie wykazywał selektywności. Wysoką enancjoselektywnością (E) w zakresie 41-100 charakteryzowały się także reakcje katalizowane przez lipazę Amano AK, ale w porównaniu do transestryfikacji zachodziły one około 13-14 razy wolniej. Generalnie, porównując czasy reakcji oraz czystości optyczne otrzymanych produktów, hydroliza enzymatyczna estrów z ugrupowaniem tetrazolowym okazała się szybszą i bardziej selektywną metodą otrzymywania optycznie czynnych pochodnych tetrazolowych (e.e. 95-99%). Dodatkowym atutem tej drugiej opracowanej przeze mnie metody jest jej większa uniwersalność. Niezależnie od budowy substratu, obecności lub braku podstawnika w pierścieniu benzenowym oraz długości łańcucha alkilowego przy atomie azotu N2 pierścienia tetrazolowego, enancjoselektywność reakcji katalizowanych przez Novozym SP 435 była bardzo wysoka (E>100).

Mieszaniny racemiczne estrów ( $\pm$ )-**4a-d** i ( $\pm$ )-**7a-d**, alkoholi ( $\pm$ )-**3a-d** i ( $\pm$ )-**6a-d** oraz enancjomery (*R*) i (*S*) tychże alkoholi zbadano pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej wobec trzech patogenów roślinnych: *Colletotrichum coccodes* (MC 1), *Fusarium sambucinum* (MF 1) i *Fusarium oxysporum* (MF5) oraz patogenu ludzkiego – *Aspergillus niger* (ATCC 16404) [H2]. Wszystkie związki posiadały właściwości grzybobójcze. Analiza relacji pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością wykazała, że wprowadzenie podstawnika w pozycję *para* pierścienia benzenowego powoduje wzrost aktywności przeciwgrzybiczej związku, w porównaniu do jego niepodstawionego analogu. Efekt ten widoczny był zarówno po wprowadzeniu podstawnika elektronodonorowego (CH<sub>3</sub>) jak i elektronoakceptorowego (Cl). Obecność natomiast atomu chloru w pozycji *orto* pierścienia benzenowego w większości przypadków nie miała istotnego wpływu na aktywność związku lub nieznacznie ją obniżała. Najbardziej aktywnymi związkami były pochodne z atomem chloru w pozycji *para* pierścienia benzenowego (w stężeniu 128  $\mu$ g/mL hamowały wzrost grzybów w zakresie 49-85%). Najwyższy potencjał grzybobójczy posiadał ( $\pm$ )-4-[5-(4-chlorofenylo)-2*H*-tetrazol-2-ilo]butan-2-ol (( $\pm$ )-**3c**), który ograniczał wzrost grzybów *A. niger* o 50% już w stężeniu 64  $\mu$ g/mL. Na podstawie uzyskanych wyników można także stwierdzić, że konfiguracja absolutna związku w tym przypadku nie miała znaczącego wpływu na jego właściwości przeciwgrzybicze. W większości przypadków procent zahamowania wzrostu patogenów traktowanych enancjomerem (*R*) lub (*S*) alkoholi ( $\pm$ )-**3a-d** i ( $\pm$ )-**6a-d** był zbliżony.

Alkohole ( $\pm$ )-**3a,b,d** i ( $\pm$ )-**6a,b,d** oraz octany ( $\pm$ )-**4a,b,d** i ( $\pm$ )-**7b,d** zbadano także pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej wobec szczepu *Candida albicans* (ATCC 90028), co

zostało opisane w pracy [H3] (związki (±)-**3c**, (±)-**6c**, (±)-**4c** i (±)-**7a,c** nie były badane, gdyż wytrały się z medium hodowlanego). Drożdże *C. albicans* wchodzi w skład naturalnej mikroflory człowieka, ale u osób z osłabionym układem immunologicznym, a więc nosiciele wirusa HIV, chorych na nowotwory, neutropenię, osób po chemioterapii, przyjmujących leki immunosupresyjne, sterydy oraz po długotrwałej antybiotykoterapii, z niegroźnego komensala mogą stać się groźnym patogenem i przyczynić się do rozwoju tzw. kandydozy.<sup>22,23</sup> O ile infekcje powierzchniowe nie stanowią zagrożenia dla życia to już ogólnoustrojowe charakteryzują się wysokim wskaźnikiem śmiertelności.<sup>22</sup> Leczenie jest bardzo trudne ze względu na dużą zjadliwość gatunku oraz wykształcone mechanizmy oporności na stosowane leki.<sup>22,24</sup> Przeprowadzone testy biologiczne wykazały, że zsyntetyzowane przez mnie 2,5-dwupodstawione tetrazole w zakresie stężeń 0,0313-16 µg/mL redukowały liczbę żywych komórek *C. albicans* o ponad 98%. Na właściwości przeciwgrzybicze związków przede wszystkim wpływała długość łańcucha alkilowego między pierścieniem tetrazolowym a grupą OH lub OAc. Czynniki decydującymi o aktywności związków (±)-**3a,b,d**, (±)-**6a,b,d** oraz (±)-**7b,d** były także rodzaj i pozycja podstawnika w pierścieniu benzenowym. Porównując wartości MIC alkoholi można stwierdzić, że pochodne butan-2-olu (±)-**3a,b** wykazywały wyższą aktywność niż pochodne propan-2-olu (±)-**6a,b**. Wyjątek stanowił alkohol (±)-**6d** z atomem chloru w pozycji *orto* pierścienia benzenowego, który okazał się znacznie bardziej aktywny (MIC=0,125 µg/mL) niż pochodna (±)-**3d** (MIC=8 µg/mL). W przypadku estrów było odwrotnie, wyższy potencjał przeciwgrzybiczy wykazywały octany propan-2-olu (±)-**7b,d** niż octany butan-2-olu (±)-**4a,b,d**. Spośród wszystkich zsyntetyzowanych związków najwyższą aktywnością przeciwgrzybiczą charakteryzował się octan (±)-1-[5-(2-chlorofenylo)-2*H*-tetrazol-2-ilo]propan-2-olu ((±)-**7d**, MFC=0,0313 µg/mL) i co istotne, w niskich stężeniach rzędu 0,125-2 µg/mL nie wywoływał efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek nabłonkowych Vero, zaś w stężeniach wyższych 64-256 µg/mL obniżał żywotność komórek tylko o 13-14%. Wykazano także, że w warunkach *in vitro* związek ten w stężeniu 16 µg/mL ograniczał o 86% adhezję komórek *C. albicans* do monowarstwy nabłonka ludzkiego (Caco-2), a tym samym zaburzał wczesną fazę formowania biofilmu *C. albicans*. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że tworzenie

<sup>22</sup> P. Eggimann, J. Garbino, D. Pittet, 2003, Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet. Infect. Dis.* 3, 685-702.

<sup>23</sup> C.-Y. Low, C. Rotstein, 2011, Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med. Rep.* 3, 14.

<sup>24</sup> S. Perea, T.F. Patterson, 2002, Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1073-1080.

biofilmu to jeden z czynników wirulencji *C. albicans*, dzięki któremu gatunek ten zyskuje wysoką oporność na mechanizmy obronne organizmu gospodarza oraz stosowane leki przeciwgrzybicze np. flukonazol.<sup>25</sup>

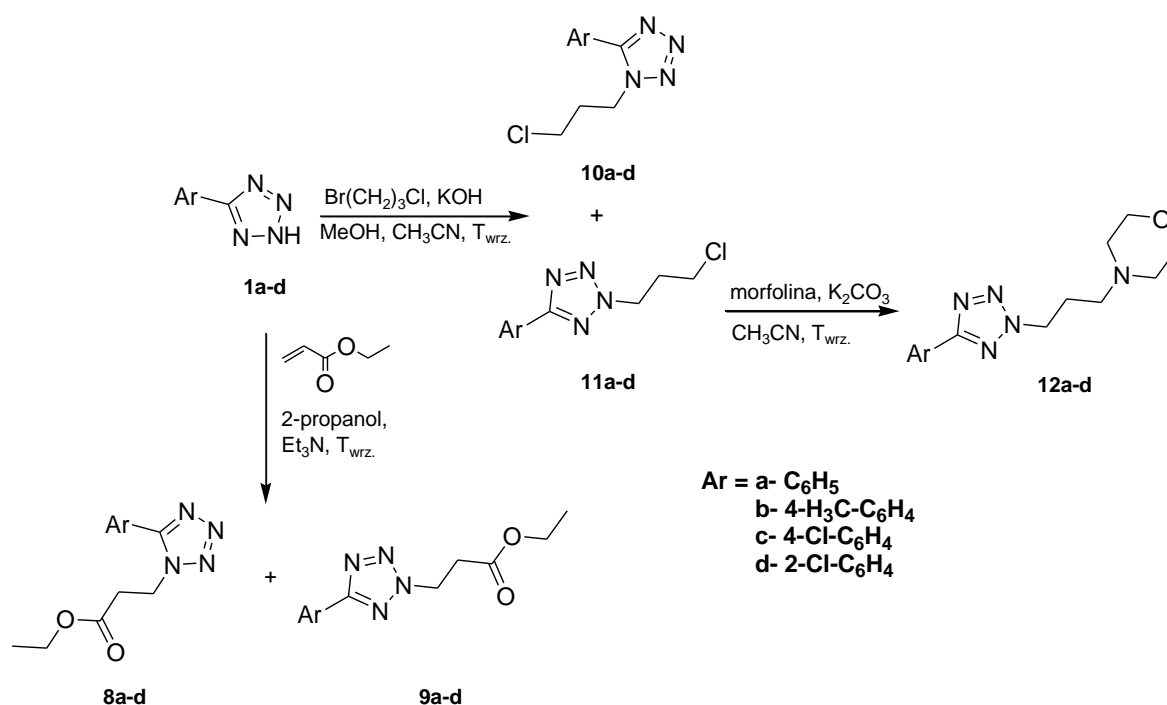
Oprócz aspektu praktycznego polegającego na wydajnej enancjoselektywnej syntezie pochodnych tetrazolowych opracowane przeze mnie i opisane w pracach [H1] i [H2] metody mają także dużą wartość poznawczą. Należy podkreślić, że w momencie opublikowania obu prac w literaturze nie było informacji na temat otrzymywania optycznie czynnych pochodnych tetrazolu z wykorzystaniem katalizy enzymatycznej i zgodnie z moją wiedzą do dnia dzisiejszego są to jedyne prace na ten temat. Dodatkowym atutem prezentowanych prac jest fakt, że otrzymane związki zgodnie z założeniem wykazują właściwości przeciwgrzybicze.

Potencjał przeciwgrzybiczy opisanych powyżej związków, w szczególności wobec drożdży *C. albicans*, zainspirował mnie do syntezy podstawionych ugrupowaniem 5-arylotetrazolowym propionianów etylu oraz pochodnych morfoliny [H9]. Za syntezą kolejnej grupy estrów przemawiała wysoka aktywność i niska cytotoksyczność otrzymanego wcześniej octanu ( $\pm$ )-1-[5-(2-chlorofenyl)-2*H*-tetrazol-2-ilo]propan-2-olu (( $\pm$ )-7d), zaś koncepcja otrzymania pochodnych tetrazolowych z podstawnikiem morfolinowym podyktowana była potencjałem farmakologicznym pierścienia morfolinowego. Ugrupowanie to występuje między innymi w antybiotykach, lekach przeciwwymiotnych, przeciwbólowych, przeciwzapalnych, antydepresyjnych oraz w związkach o działaniu przeciwnowotworowym, przeciw pasożytniczym i przeciwgrzybiczym.<sup>26</sup> W związku z powyższym interesujące wydało mi się sprawdzenie jak pierścień morfolinowy wpłynie na aktywność przeciwgrzybiczą pochodnych tetrazolu.

Pierwszą grupę związków, pochodne propionianu etylu **8a-d** i **9a-d**, otrzymałam w wyniku addycji Michaela 5-arylotetrazoli **1a-d** do akrylanu etylu (Schemat 4). Reakcje zachodziły z utworzeniem w przewodze 2,5-dwupodstawionych tetrazoli **9a-d**. Nie była to zatem 100% regioselektywność, jak w przypadku wcześniej opisanych reakcji, gdy akceptorem Michaela był keton metylo-winylowy. Stosunek wagowy wydzielonych izomerów 2,5- do 1,5-dwupodstawionych uzależniony był od charakteru podstawnika w pierścieniu benzenowym.

<sup>25</sup> K.A. Marr, T.C. White, van J.A. Burik, R.A. Bowden, 1997, Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 25, 908-910.

<sup>26</sup> M.J. Naim, O. Alam, Md J. Alam, P. Alam, N. Shrivastava, 2015, A review on pharmacological profile on morpholine derivatives. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.* 3, 40-51.



**Schemat 4.** Synteza 1,5- i 2,5-dwupodstawionych tetrazoli.

Najwięcej 1,5-dwupodstawionego izomeru powstało w reakcji 5-(2-chlorofenylo)tetrazolu (**1d**) z akrylanem etylu, zaś najmniej (śladowe ilości) w przypadku pochodnej z atomem chloru w pozycji *para*. Izomery **8a** i **9a** zostały wcześniej opisane w literaturze, w kontekście syntezy antycholinergicznych tetrazolowych pochodnych kwasu propionowego.<sup>27</sup> Związki te otrzymano z sumaryczną wydajnością 40-41% w wyniku alkilowania 5-fenylotetrazolu 3-bromopropionianem etylu w warunkach zasadowych. Autorzy cytowanej publikacji niską wydajność reakcji tłumaczyli rozkładem związków podczas destylacji. Zaproponowana przeze mnie procedura syntezy, rozdzielania i oczyszczania izomerów **8a** i **9a** okazała się ponad dwukrotnie bardziej wydajnym rozwiązaniem (W=95%). Skuteczność i uniwersalność metody potwierdziły także wysokie wydajności (75-90%) pozostałych reakcji.

Pochodne tetrazolu z podstawnikiem morfolinowym **12a-d** otrzymałam w wyniku dwuetapowej syntezy przedstawionej także na Schemacie 4. Etap pierwszy obejmował syntezę czynników alkilujących, 2-(3-chloropropylo)-5-arylo-2*H*-tetrazoli **11a-d**. Związki te otrzymałam w wyniku N-alkilowania 5-arylotetrazoli **1a-d** 1-bromo-3-chloropropanem. Reakcje prowadziłam w warunkach, które wcześniej opracowałam dla reakcji N-alkilowania

<sup>27</sup> A.K. Sorensen, N.A. Klitgaard, 1972, Synthesis of some new tetrazolylacetic acids and the corresponding 3-substituted propionic acids. *Acta Chem. Scand.* 26, 541-548.

4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu 1-bromo-3-chloropropanem (praca ta zostanie omówiona w dalszej części niniejszego opracowania). Funkcjonalizacja pierścienia tetrazolowego zachodziła z wysoką regioselektywnością (w przewodzie powstawały 2,5-dwupodstawione tetrazole **11a-d**). Podobnie jak wcześniej stosunek wagowy wydzielonych izomerów 2,5- do 1,5-dwupodstawionych uzależniony był od typu i pozycji podstawnika w pierścieniu benzenowym 5-arylotetrazoli **1a-d**. Wprowadzenie grupy metylowej lub atomu chloru w pozycję *para* pierścienia benzenowego powodowało wzrost regioselektywności reakcji, zaś obecność fluorowca w pozycji *orto* spadek. Spośród zsyntetyzowanych przeze mnie pochodnych tetrazolu **10a-d** i **11a-d** izomery **10a** i **11a** zostały wcześniej opisane w literaturze.<sup>28</sup> Opublikowana metoda syntezy polega na alkilowaniu 5-fenylotetrazolu (**1a**) 1-bromo-3-chloropropanem w obecności wodoru sodu, w dimetyloformamidzie. Z praktycznego punktu widzenia zaproponowana przeze mnie procedura jest bezpieczniejsza. Dobrą alternatywą dla opracowanej przeze mnie metody jest prowadzenie reakcji w acetonie, w obecności węgla potasu.<sup>29</sup> Pragnę jednak zaznaczyć, że cytowana praca została zgłoszona do publikacji w tym samym roku (różnica 2,5 miesiący) co praca, której jestem współautorem [H9]. Pochodne **12a-d** otrzymałam z wydajnościami 75-87% w wyniku N-alkilowania morfoliny izomerami **11a-d**.

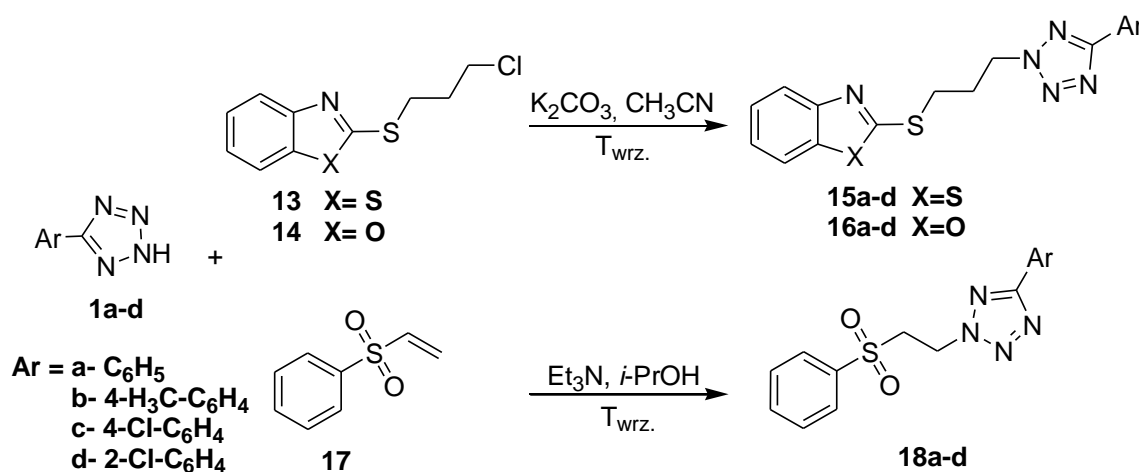
Zsyntetyzowane pochodne tetrazolowe, oprócz **8c**, **10b** oraz **10c**, przebadano pod kątem właściwości przeciwgrzybiczych wobec szczepu *C. albicans* (ATCC 90028). Wszystkie związki niezależnie od budowy wykazywały działanie grzybobójcze. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że rodzaj podstawnika przy atomie azotu *N1* lub *N2* pierścienia tetrazolowego nie okazywał istotnego wpływu na procent zahamowania wzrostu jtk (jednostek tworzących kolonie) *C. albicans* (>90% redukcji wzrostu jtk *C. albicans* traktowanych przez 48 godzin badanymi związkami w zakresie stężeń 0,0313-16 µg/mL). Budowa związku miała jednak wpływ na jego cytotoksyczność, co potwierdziły testy aktywności metabolicznej XTT przeprowadzone w warunkach *in vitro* dla trzech reprezentatywnych pochodnych tetrazolowych (**9a**, **10d** i **12b**) względem komórek nowotworowych linii Caco-2. W stężeniu 0,0313 µg/mL dwa pierwsze związki były nietoksyczne, zaś pochodna z podstawnikiem morfolinowym **12b** wykazywała słabe

<sup>28</sup> T. Kimura, Y. Takase, K. Hayashi, H. Tanaka, I. Ohtsuka, T. Seeki, M. Kogushi, T. Yamada, T. Fujimori, I. Saitou, K. Akasaka, 1993, Structure-activity relationship of *N*-[2-(dimethylamino)-6-[3-(5-methyl-4-phenyl-1*H*-imidazol-1-yl)propoxy]phenyl]-*N'*-pentylurea and analogues. Novel potent inhibitors of acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase with antiatherosclerotic activity. *J. Med. Chem.* 36, 1630-1640.

<sup>29</sup> S. Pudiel, X. Min, S. Acharya, D.B. Khadka, G. Yoon, K.-M. Kim, S.H. Cheon, 2017, Triple reuptake inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationship of benzylpiperidine-tetrazoles. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 5278-5289.

działanie cytotoksyczne (przeżywalność komórek na poziome 81%). W związku z powyższym sprawdzono także cytotoksyczność związków **9a** i **10d** w warunkach *in vivo* na organizmie modelowym bezkręgowca *Galleria mellonella*. Oba związki w najwyższym badanym stężeniu 256 µg/mL były nietoksyczne. Wykazano także, że spośród wytypowanych struktur 3-(5-fenilo-2*H*-tetrazol-2-ilo)propionian etylu (**9a**) najskuteczniej hamował kluczowy atrybut wirulencji, będący pierwszym etapem formowania biofilmu tj. adhezję komórek *C. albicans* do monowarstwy Caco-2. Związek ten w stężeniu 256 µg/mL wpływał także na dojrzałą strukturę biofilmu. Badania *in vivo* dostarczyły również informacji na temat aktywności 3-(5-fenilo-2*H*-tetrazol-2-ilo)propionianu etylu (**9a**) w hamowaniu infekcji o etiologii *Candida* spp. u owadów. Zaaplikowanie związku **9a** w stężeniu 16 µg/mL larwom (przed infekcją zawiesiną komórek *C. albicans*) prowadziło do wzrostu przeżywalności larw w stosunku do organizmów nie traktowanych badanym związkiem. Biorąc pod uwagę duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne układu immunologicznego larw *G. mellonella* do układu odpornościowego kręgowców wyniki uzyskane dla związku **9a** mogą mieć znaczenie kliniczne.

Ciekawe wyniki badań biologicznych zachęciły mnie do opracowania warunków syntezy kolejnych pochodnych tetrazolowych zawierających ugrupowanie benzotiazolu, benzoksazolu lub benzenosulfonylowe [H8]. Przeprowadzone reakcje przedstawia Schemat 5.



**Schemat 5.** Synteza pochodnych tetrazolowych z ugrupowaniem benzotiazolu, benzoksazolu oraz benzenosulfonylowym.

5-Arylotetrazole **1a-d** i sulfon fenyloowo-winyloowy (**17**) otrzymałam zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze.<sup>20,30</sup> Badania obejmowały syntezę czynników alkilujących: 2-[(3-chloropropylo)sulfanylo]-1,3-benzotiazolu (**13**) i 2-[(3-chloropropylo)sulfanylo]-1,3-benzoksazolu (**14**). Do ich otrzymania zaproponowałam reakcję S-alkilowania odpowiednich 2-sulfanylobenzoazoli 1-bromo-3-chloropropanem w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego (PTC). Oba związki otrzymałam z wysokimi wydajnościami, odpowiednio 76% i 82%. Pochodne tetrazolowe z ugrupowaniem benzoazolu otrzymałam w wyniku N-alkilowania 5-arylotetrazoli **1a-d** zsyntetyzowanymi czynnikami alkilującymi **13** i **14**. Na przykładzie N-alkilowania 5-fenylotetrazolu (**1a**) 2-[(3-chloropropylo)sulfanylo]-1,3-benzotiazolem (**13**) wykazałam, że reakcja zachodzi najwydajniej w obecności węgla potasu, w acetonitrylu, w temperaturze wrzenia mieszaniny reakcyjnej i te warunki zastosowałam do syntezy pozostałych benzotiazolowych i benzoksazolowych pochodnych tetrazolu. Reakcje zachodziły z wydajnościami od 31% do 52%. Czynnikiem determinującym te wartości bez wątpienia był etap izolacji i oczyszczania produktów. Związki oczyszczane były najpierw metodą chromatografii kolumnowej, a następnie na płytach preparatywnych. Wszystkie wyizolowane pochodne były 2,5-dwupodstawionymi tetrazolami, co sugeruje regioselektywny przebieg reakcji. Niemniej jednak biorąc pod uwagę ilość produktów ubocznych, których wydzielenie i identyfikacja okazały się niemożliwe, nie można całkowicie wykluczyć tworzenia się śladowych ilości 1,5-dwupodstawionych tetrazoli. Analizując czas reakcji można stwierdzić, że jej przebieg był uzależniony od budowy 5-arylotetrazoli **1a-d**. Obecność podstawnika w pozycji *para* lub *orto* pierścienia benzenowego zmniejszała szybkość reakcji, a tym samym wydłużała jej czas. Efekt ten widoczny był zarówno w przypadku podstawnika elektronodonorowego (CH<sub>3</sub>) jak i elektronoakceptorowego (Cl). Zależności tej nie obserwowałam w przypadku syntezy pochodnych tetrazolowych z grupą benzenosulfonylową **18a-d**. Związki te otrzymałam z wydajnościami 59-76% w wyniku addycji Michaela 5-arylotetrazoli **1a-d** do sulfonu fenyloowo-winyloowego (**17**). Wykazałam, że parametrem wpływającym na szybkość reakcji jest temperatura. Prowadząc reakcje w temperaturze wrzenia mieszaniny reakcyjnej można w krótkim czasie (2,5-3 godziny) otrzymać serię nowych 2,5-dwupodstawionych tetrazoli **18a-d**.

<sup>30</sup> N.O. Brace, 1993, An economical and convenient synthesis of phenyl vinyl sulfone from benzenethiol and 1,2-dichloroethane. *J. Org. Chem.* 58, 4506-4508.

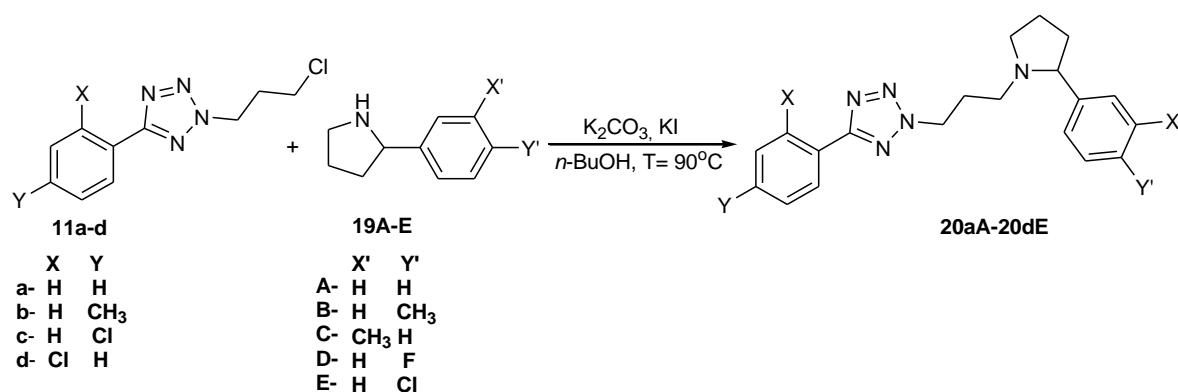
Otrzymane związki, podobnie jak te wcześniej opisane, w zakresie stężeń 0,0313-16 µg/mL działały grzybostatycznie wobec drożdży *C. albicans*. Niezależnie od ich budowy poziom redukcji wzrostu jkt *C. albicans* był bardzo wysoki (97-99%). Niemniej jednak niewielkie różnice w otrzymanych wynikach wskazują na zależność między strukturą związku a jego aktywnością biologiczną. Na właściwości przeciwgrzybicze związków wpływał rodzaj podstawnika przy atomie azotu N2 pierścienia tetrazolowego oraz charakter i pozycja podstawnika w pierścieniu benzenowym ugrupowania 5-arylotetrazolowego. Najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały pochodne z podstawnikiem 3-(2-sulfanylo-1,3-benzoksazolo)propylowym przy atomie azotu N2 pierścienia tetrazolowego, posiadające w ugrupowaniu 5-arylotetrazolowym atom chloru w pozycji *para* (**16c**) lub w pozycji *orto* (**16d**). Na przykładzie tetrazolowych pochodnych benzoksazolu **16c** i **16d** wykazano, że mechanizm działania otrzymanych związków związany jest z zaburzeniem integralności ściany komórkowej/biosyntezy składników ściany komórkowej *C. albicans* (zmiana wartości MIC w obecności regulatora osmotyczności – sorbitolu). Wykazano także, że właściwości przeciwgrzybicze pochodnych **16c** i **16d** wzrastają w obecności flukonazolu (zmiana MIC z >16 µg/mL na 1,25 µg/mL). Dodatkowo pochodne te były nietoksyczne wobec organizmu modelowego *G. mellonella* (badania w warunkach *in vivo*), co czyni je interesującymi strukturami wiodącymi w poszukiwaniu nowych antymikotyków.

Budowa związków wpływała także na ich aktywność wobec grzybów strzępkowych *C. coccodes*. Najwyższy potencjał przeciwgrzybiczy wykazywały pochodne tetrazolu z ugrupowaniem benzoksazolu **16a-c** oraz pochodne z podstawnikiem benzenosulfonylowym **18a** i **18d** (w stężeniu 64 µg/mL ograniczały wzrost *C. coccodes* o ponad 40%). Aktywność tych związków zależała także od rodzaju podstawnika w pierścieniu benzenowym fragmentu 5-arylotetrazolowego. Wzrost aktywności przeciwgrzybiczej pochodnych benzoksazolu następował po wprowadzeniu elektroujemnego atomu chloru w pozycję *para* (pochodna **16c**). W przypadku związków z ugrupowaniem benzenosulfonylowym najwyższą aktywność wykazywała pochodna z atomem chloru w pozycji *orto* (**18d**).

Kolejnymi obiektami moich badań były pochodne tetrazolowe z ugrupowaniem 2-arylopirolidyny [**H11**]. Do ich syntezy wykorzystałam uprzednio otrzymane i wykazujące właściwości grzybostatyczne względem *C. albicans* 2-(3-chloropropylo)-5-arylo-2*H*-tetrazole **11a-d**. Na ówczesnym etapie badań interesowało mnie czy rozbudowanie ich struktury o fragment 2-arylopirolidynowy doprowadzi do otrzymania nowych aktywniejszych związków, tym bardziej że w literaturze opisanych jest wiele pochodnych



pirolidyny wykazujących właściwości przeciwgrzybicze (szczegółowy przegląd literatury przedstawiony został we wstępie pracy [H11]). Zastosowana metoda syntezy polegała na N-alkilowaniu 2-arylopirolidyn **19A-E** wyżej wymienionymi czynnikami alkilującymi (Schemat 6). 2-Arylopirolidyny otrzymałam zgodnie z procedurami literaturowymi (szczegóły w pracy [H11]).



**Schemat 6.** Synteza pochodnych tetrazolowych z ugrupowaniem 2-arylopirolidyny.

Efektem przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów było otrzymanie i scharakteryzowanie 20 nowych związków. Wszystkie pirolidynowe pochodne tetrazolu w zakresie stężeń 0,08-47,9  $\mu\text{M}$  wykazywały działanie grzybostatyczne wobec drożdży *C. albicans* (> 90% redukcji wzrostu jtk *C. albicans*). Wytypowane do dalszych badań najbardziej aktywne związki: **20aA**, **20aC**, **20cD** i **20cE** nie wywoływały w tym zakresie stężeń ubocznego efektu toksycznego wobec komórek nabłonkowych Vero (ATCC CCL-81). Związki **20aA**, **20aC** i **20cD** były także nietoksyczne wobec larw *G. mellonella* w warunkach *in vivo*, a w stężeniu odpowiednio 47,90  $\mu\text{M}$ , 46,05  $\mu\text{M}$  oraz 41,47  $\mu\text{M}$  ograniczały o ponad 95% adhezję komórek *C. albicans* do monowarstwy komórek TR-146 (linia komórek adherentnych ludzkiego nowotworu błony śluzowej policzka), a więc wpływały na wczesną fazę formowania biofilmu. Pochodne **20aA** i **20cD** skutecznie ograniczały także tworzenie dojrzałej struktury biofilmu *C. albicans* oraz hamowały rozwój kandydozy u larw *G. mellonella*. Warto zwrócić uwagę, że wśród najbardziej aktywnych związków po raz kolejny pojawiła się pochodna z atomem chloru w pozycji *orto* pierścienia benzenowego ugrupowania 5-arylotetrazolowego (**20cD**), co pozwala mi stwierdzić, że podstawnik ten istotnie wpływa na właściwości przeciwgrzybicze pochodnych tetrazolu.

Z praktycznego punktu widzenia uważam, że przeprowadzone przeze mnie modyfikacje struktury 5-arylotetrazoli **1a-d**, a tym samym zsyntetyzowana grupa nowych aktywnych biologicznie pochodnych tetrazolowych, mają dużą wartość poznawczą. Uzyskana dzięki współpracy z innymi zespołami badawczymi wiedza na temat aktywności przeciwgrzybiczej tych związków, cytotoksyczności w warunkach *in vitro* i *in vivo*, wpływu na czynniki wirulencji *C. albicans* oraz przeprowadzona przeze mnie analiza zależności struktura – aktywność biologiczna będą pomocne w projektowaniu i syntezie nowych antymikotyków skutecznych w zwalczaniu infekcji o etiologii *Candida* spp.

### Synteza i aktywność biologiczna pochodnych benzimidazolu i benzotriazolu

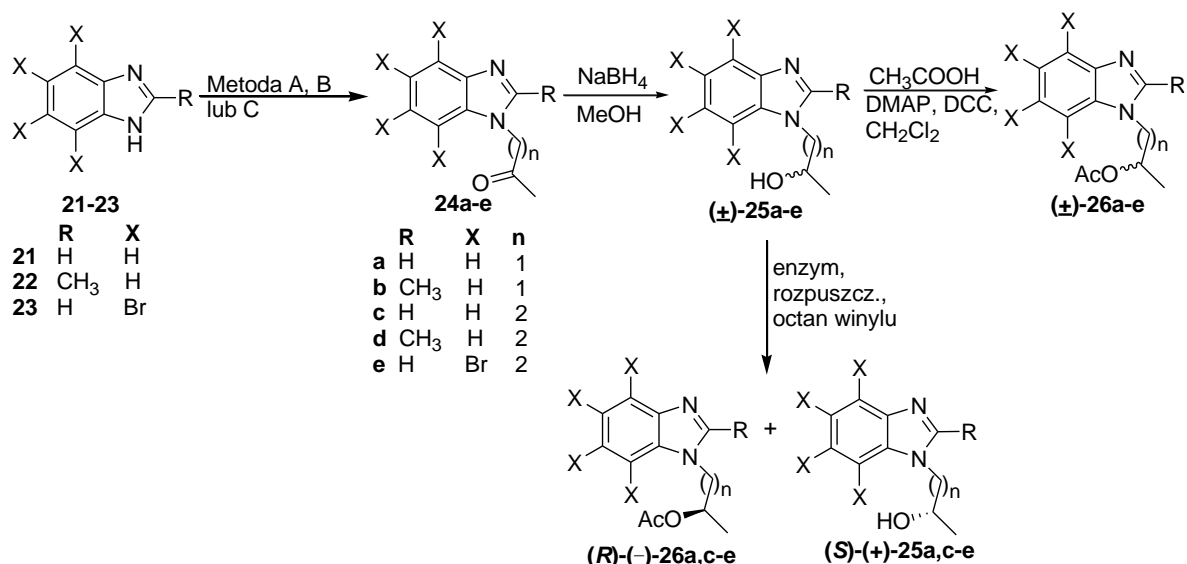
Poza pochodnymi tetrazolu obiektem moich zainteresowań badawczych były związki z ugrupowaniem benzimidazolu i benzotriazolu. Skupienie uwagi na kolejnych grupach azoli podyktowane było potencjałem farmakologicznym wymienionych benzoazoli. Pierścień benzimidazolowy uważa się za tzw. strukturę uprzywilejowaną.<sup>31</sup> Ugrupowanie to występuje m.in. w substancjach czynnych leków o działaniu przeciwpasożytniczym (np. albendazol, mebendazol, tiabendazol), przeciwzakrzepowym (np. dabigatran), antyhipotensyjnym (np. kandesartan, telmisartan), antyalergicznym (np. astemizol, emedastyna) oraz przeciwwrzdodowym (np. omeprazol, lanzoprazol).<sup>32</sup> Poza tym w literaturze opisano szereg pochodnych benzimidazolu wykazujących aktywność przeciwzapalną, przeciwnowotworową, przeciwwirusową, przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą.<sup>31,33</sup> Szerokim spektrum aktywności biologicznej charakteryzują się także pochodne benzotriazolu.<sup>34</sup> Związki te wykazują m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe, przeciwpierwotniakowe oraz przeciwnowotworowe.<sup>34</sup> W wyniku przeprowadzonych badań otrzymałam serię nowych optycznie czynnych *N*-podstawionych pochodnych benzimidazolu. Związki te uzyskałam łącząc tradycyjną syntezę chemiczną z enancjoróżnicującymi biotrasformacjami. Przeprowadzone reakcje opisałam w pracy [H5], a ilustruje je Schemat 7.

<sup>31</sup>O.O. Ajani, D.V. Aderohunmu, C.O. Ikpo, A.E. Adedapo, I.O. Olanrewaju, 2016, Functionalized benzimidazole scaffolds: privileged heterocycle for drug design in therapeutic medicine. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 349, 475-506.

<sup>32</sup>B. Soni, 2014, A short review on potential activities of benzimidazole derivatives. *PharmaTutor* 2, 110-118.

<sup>33</sup>P.M.K. Prasad, A.S. Kanvinde, S. Raja, 2016, Potent biological agent benzimidazole - a review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 22-33.

<sup>34</sup>I. Briguglio, S. Piras, P. Corona, E. Gavini, M. Nieddu, G. Boatto, A. Carta, 2015, Benzotriazole: an overview on its versatile biological behaviour. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 612-648.



**Schemat 7.** Synteza optycznie czynnych pochodnych benzimidazolu. Metoda A (zw. **24a,b**): ClCH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, T<sub>wrz.</sub>; Metoda B (zw. **24c,d**): CH<sub>3</sub>COCH=CH<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, 2-propanol, T<sub>wrz.</sub>; Metoda C (zw. **24e**): CH<sub>3</sub>COCH=CH<sub>2</sub>, 2-propanol, T<sub>wrz.</sub>

Do syntezy ketonów **24a-e** wykorzystałam dwa typy reakcji: N-alkilowanie oraz addycję Michaela. 2-Oksopropylowe pochodne benzimidazolu **24a-b** otrzymałam z wydajnościami 52% i 54% po 24 godzinach prowadzenia reakcji. W przypadku syntezy 3-oksobutylowych pochodnych benzimidazolu **24c-e** czas reakcji uzależniony był od zatłoczenia sterycznego wokół pierścienia benzimidazolu. Obecność grupy metylowej w pozycji C2 benzimidazolu powodowała wydłużenie czasu reakcji z 2 godzin do 24 godzin, zaś obecność czterech atomów bromu w pozycjach C4, C5, C6 i C7 benzimidazolu wydłużała czas reakcji do 120 godzin. Wszystkie zsyntetyzowane ketony, w wyniku redukcji borowodorkiem sodu, przekształcałam w mieszaniny racemiczne alkoholi (±)-**25a-e**, a te z kolei w octany (±)-**26a-e**. Wykazałam, że reakcja acylowania najwydajniej (76-95%) zachodzi pod wpływem lodowatego kwasu octowego jako czynnika acylującego w obecności *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) oraz 4-(dimetyloamino)pirydyny (DMAP), w bezwodnym dichlorometanie. Efektem przeprowadzonych badań było także opracowanie warunków kinetycznego enzymatycznego rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi (±)-**25a,c-e**. Wykazałam, że optycznie czynne (*R*)-estry i (*S*)-alkohole z ugrupowaniem benzimidazolu można otrzymać w wyniku katalizowanej przez lipazy transestryfikacji octanu winylu alkoholami (±)-**25a,c-e**. Z punktu widzenia efektywności procesu, nadmiaru enancjomerycznych produktów (e.e.) oraz enancjoselektywności reakcji (E), optymalnymi biokatalizatorami były lipaza Amano AK oraz Novozym SP 435. Istotnym czynnikiem

wpływającym na właściwości katalityczne tych enzymów była budowa substratu, a mianowicie pozycja i rodzaj podstawnika w pierścieniu benzimidazolowym oraz odległość pierścienia benzimidazolowego od stanowiącej centrum reakcji grupy hydroksylowej. Badania wykazały, że podstawnik metylowy w pozycji C2 pierścienia benzimidazolowego w pochodnej propan-2-olu ( $\pm$ )-**25b** stanowi zawadę przestrzenną przez co reakcja nie zachodzi. Efektu tego nie obserwuje się po zwiększeniu odległości między ugrupowaniem heterocyklicznym a grupą hydroksylową o jedną grupę metylenową. Wykazałam także, że na enancjoselektywność enzymów wpływa środowisko reakcji. Spośród testowanych rozpuszczalników (eter *tert*-butyloowo-metylowy, toluen, eter dietylowy, dichlorometan, tetrahydrofuran) w większości przypadków optymalnym rozwiązaniem okazało się użycie tetrahydrofuranu lub chlorku metylenu ( $E > 100$ ). Pod względem stereochemicznym reakcje zachodziły zgodnie z regułą Kazlauskasa.<sup>35</sup> Produktami reakcji były (*R*)-estry, co zostało potwierdzone analizą rentgenograficzną monokryształu octanu (-)-4-(4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazol-1-ilo)butan-2-olu ((-)-**26e**) oraz pozostawały w mieszaninie nieprzereagowane (*S*)-alkohole.

Zsyntetyzowane przez mnie ketony **24a-d**, alkohole ( $\pm$ )-**25a-d** oraz estry ( $\pm$ )-**26a-d** wykazywały właściwości przeciwgrzybicze względem szczepu *C. albicans*. Wszystkie wymienione związki w zakresie stężeń 0,25-16  $\mu\text{g/mL}$  redukowały liczbę jtk *C. albicans* o ponad 97%. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się alkohole ( $\pm$ )-**25a-d** oraz estry ( $\pm$ )-**26a-d**, które w stężeniu 16  $\mu\text{g/mL}$  ograniczały wzrost patogenu o ponad 99%. Żaden z otrzymanych związków nie spowodował 100% inhibicji wzrostu *C. albicans*, co świadczy o ich grzybostatycznym działaniu. Do testów aktywności przeciwgrzybiczej nie zostały zakwalifikowane pochodne 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu **24-26e** ze względu na słabą rozpuszczalność.

Halogenowe pochodne benzimidazolu były głównym tematem moich dalszych prac badawczych poświęconych poszukiwaniu nowych inhibitorów kinazy białkowej CK2 (poprzednia nazwa kinaza kazeinowa 2). Enzym ten należy do grupy kinaz serynowo – treoninowych, które zaangażowane są w regulację wielu procesów metabolicznych w komórce, w szczególności w regulację wzrostu i proliferacji komórek.<sup>36,37</sup> Wykazano, że

<sup>35</sup> Q. Jing, R.J. Kazlauskas, 2008, Determination of absolute configuration of secondary alcohols using lipase-catalyzed kinetic resolutions. *Chirality*, 20, 724-735.

<sup>36</sup> D.W. Litchfield, 2003, Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369, 1-15.

<sup>37</sup> K. Ahmed, D.A. Gerber, C. Cochet, 2002, Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 12, 226-229.

podwyższony poziom kinazy białkowej CK2 występuje w wielu rodzajach nowotworów, np. białaczce, raku płuc, sutka, prostaty czy jelita grubego.<sup>38,39</sup> Enzym ten uczestniczy w regulacji aktywności białek działających jako wielofunkcyjne supresory nowotworowe (np. AKT, PTEN, p53), przez co prowadzi do zahamowania apoptozy w komórkach nowotworowych.<sup>40,41</sup> W związku z powyższym obniżanie aktywności CK2 poprzez zastosowanie odpowiednich inhibitorów indukuje apoptozę w komórkach, co zachęca do zastosowania tego podejścia w terapii przeciwnowotworowej.<sup>42</sup> Wśród opisanych w literaturze wielu klas inhibitorów CK2 ważną pozycję zajmują halogenowe pochodne benzimidazolu oraz benzotriazolu, stąd też moje zainteresowanie modyfikacją struktury 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu (TBBi) oraz 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolu (TBBt).

W pracy [H4] opisałam serię aminowych pochodnych 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu (TBBi). Związki te otrzymałam w wyniku trzyetapowej syntezy przedstawionej na Schemacie 8. W badaniach zastosowałam aminy różniące się między sobą charakterem, rzędowością oraz zasadowością dzięki czemu otrzymałam zróżnicowane strukturalnie produkty oraz mogłam przeprowadzić analizę zależności struktura chemiczna – aktywność biologiczna. TBBi (**23**) otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w literaturze.<sup>43</sup> Zasadniczym etapem przedstawionej syntezy była optymalizacja warunków otrzymywania czynnika alkilującego – 4,5,6,7-tetrabromo-1-(3-chloropropyl)-1*H*-benzimidazolu (**27**). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazałam, że związek ten można otrzymać z wysoką wydajnością (92%) przez alkilowanie 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu (**23**) 1-bromo-3-chloropropanem w obecności wodorotlenku potasu, w mieszaninie rozpuszczalników metanol/acetonitryl. Pozostałe sprawdzone warianty, polegające na użyciu jako zasady wodorotlenku sodu (NaH) lub 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-

<sup>38</sup> S. Tawfic, S. Yu, H. Wang, R. Faust, A. Davis, K. Ahmed, 2001, Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* 16, 573-582.

<sup>39</sup> U. Münstermann, G. Fritz, G. Seitz, L. Yiping, H.R. Schneider, O.-G. Issinger, 1990, Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur. J. Biochem.* 189, 251-257.

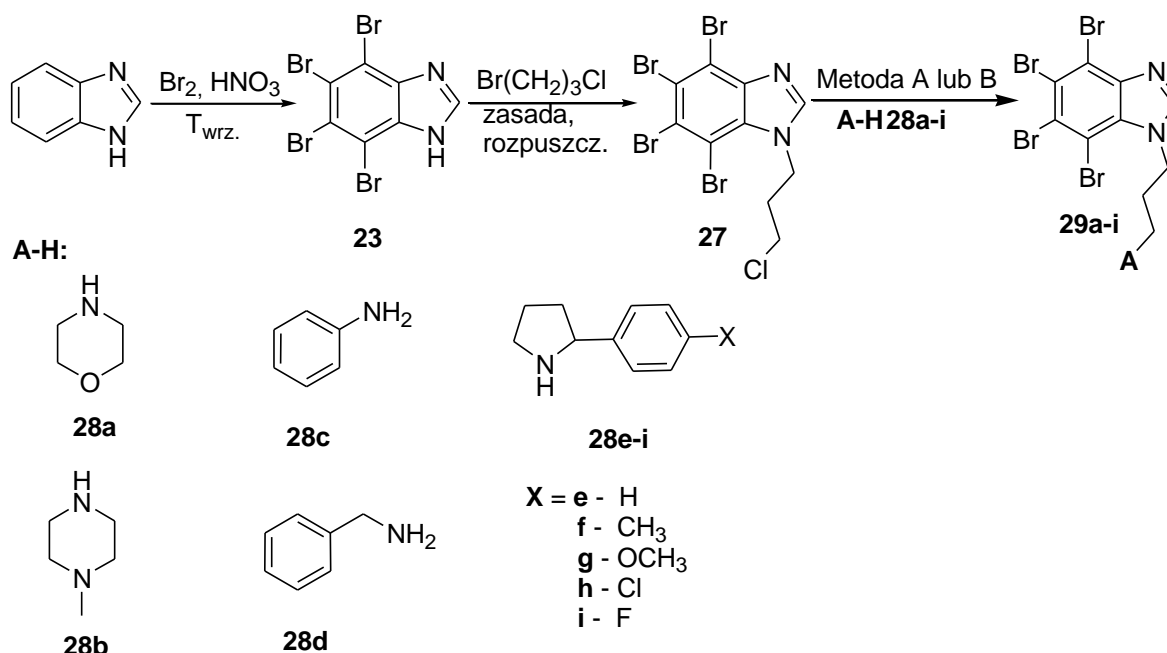
<sup>40</sup> I. M. Hanif, I.M. Hanif, M.A. Shazib, K.A. Ahmed, S. Pervaiz, 2010, Casein kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1602-1605.

<sup>41</sup> L. McKendrick, D. Milne, D. Meek, 1999, Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. *Mol. Cell. Biochem.* 191, 187-99.

<sup>42</sup> M.M.J. Chua, C.E. Ortega, A. Sheikh, M. Lee, H. Abdul-Rassoul, K.L. Hartshorn, I. Dominguez, 2017, CK2 in cancer: cellular and biochemical mechanisms and potential therapeutic target. *Pharmaceuticals*, 10, 18.

<sup>43</sup> P. Zień, M. Bretner, K. Zastąpiło, R. Szyszka, D. Shugar, 2003, Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole as an ATP-competitive potent inhibitor of protein kinase CK2 from various sources. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 129-133.

enu (DBU) prowadziły do otrzymania produktu ze znacznie niższą wydajnością ( $W = 44\%$  i  $W = 64\%$ ).

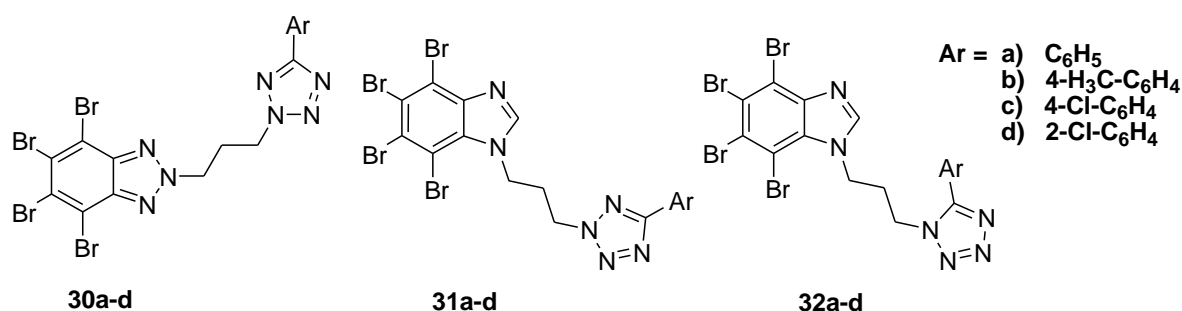


**Schemat 8.** Synteza pochodnych 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu (Metoda A (zw. **29a**):  $K_2CO_3$ ,  $CH_3CN$ ,  $T_{wrz.}$ ; Metoda B (zw. **29b-i**):  $KI$ ,  $K_2CO_3$ ,  $n$ -BuOH,  $90^\circ C$ ).

Opracowałam także optymalne warunki N-alkilowania amin **28a-i** zsyntetyzowanym 4,5,6,7-tetrabromo-1-(3-chloropropylo)-1*H*-benzimidazolem (**27**). Wykazałam, że reakcja N-alkilowania morfoliny zachodzi efektywnie w obecności węglanu potasu, w acetonitrylu, w temperaturze wrzenia mieszaniny reakcyjnej, zaś w przypadku pozostałych amin wysokie wydajności reakcji można uzyskać zwiększając reaktywność czynnika alkilującego, co uzyskałam dodając do środowiska reakcji jodek potasu i zmieniając rozpuszczalnik na *n*-butanol. Zachodzące z wydajnościami rzędu 58-91% reakcje N-alkilowania amin **28b-i** świadczą o szerokim zakresie stosowalności opracowanej przeze mnie metody.

Kolejną grupą zsyntetyzowanych przeze mnie związków były pochodne 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu oraz 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolu zawierające ugrupowanie 5-arylotetrazolu [**H6**]. Koncepcja tej pracy zakładała, że dodatkowe ugrupowanie azolowe w cząsteczce inhibitora zwiększy jego potencjał biologiczny. Zaprojektowane struktury wydawały się interesujące, tym bardziej że w literaturze opisano przykłady aktywnych biologicznie pochodnych indolu, benzimidazolu

oraz benzotriazolu zawierających ugrupowanie tetrazolu (przeгляд literatury w pracy [H6]). Struktury otrzymanych związków przedstawione zostały na Rysunku 2. Ich synteza polegała na N-alkilowaniu otrzymanych zgodnie z procedurami literaturowymi 5-arylotetrazoli **1a-d**<sup>20</sup> 4,5,6,7-tetrabromo-1-(3-chloropropylo)-1*H*-benzimidazolem lub 4,5,6,7-tetrabromo-2-(3-chloropropylo)-2*H*-benzotriazolem. Syntezę 1-(3-chloropropylo)-1*H*-benzimidazolu opisałam powyżej i przedstawiłam w pracy [H4]. Opracowana metoda sprawdziła się także w przypadku syntezy 4,5,6,7-tetrabromo-2-(3-chloropropylo)-2*H*-benzotriazolu.



**Rysunek 2.** Tetrazolowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu oraz 4,5,6,7-tetrabromo-2*H*-benzotriazolu.

W zależności od użytego czynnika alkilującego reakcje N-alkilowania 5-arylotetrazoli zachodziły regioselektywnie lub z wysoką regioselektywnością. W przypadku pochodnej benzotriazolu wydzielonymi i oczyszczonymi produktami reakcji były 2,5-dwupodstawione tetrazole **30a-d**, zaś w przypadku pochodnej benzimidazolu mieszanina 2,5- i 1,5-dwupodstawionych tetrazoli **31a-d** i **32a-d**. Ich stosunek wagowy zależał od pozycji i charakteru podstawnika w pierścieniu benzenowym, w cząsteczce 5-arylotetrazolu. Największy wpływ na stosunek izomerów miał atom chloru, który w pozycji *para* zwiększał regioselektywność reakcji (stosunek wagowy izomeru **31c:32c** wynosił 13,5:1), zaś w pozycji *orto* obniżał ją (stosunek wagowy izomeru **31d:32d** wynosił 2,8:1).

Wbrew moim oczekiwaniom otrzymane związki były słabszymi inhibitorami kinazy białkowej CK2 niż TBBi (IC<sub>50</sub> 1,3 μM) oraz TBBt (IC<sub>50</sub> 0,46 μM).<sup>44</sup> Badania wpływu zsyntetyzowanych związków na aktywność podjednostki katalitycznej α kinazy CK2 wykazały, że wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki inhibitora maleje jego zdolność do hamowania aktywności enzymu.<sup>44</sup> Spośród otrzymanych przeze mnie pochodnych TBBi najsilniejsze działanie wykazywał 4,5,6,7-tetrabromo-1-(3-chloropropylo)-1*H*-

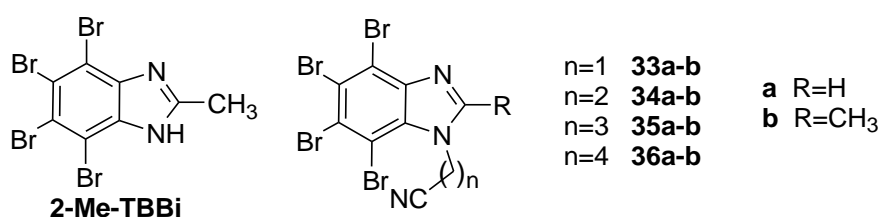
<sup>44</sup> M. Makowska, E. Łukowska-Chojnacka, P. Wińska, A. Kuś, A. Bilińska-Chomik, M. Bretner, 2011, Design and synthesis of CK2 inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.* 356, 91-96.

benzimidazol (**27**,  $IC_{50}$  3  $\mu$ M).<sup>44</sup> Modyfikacja jego struktury polegająca na podstawieniu atomu chloru pierścieniem morfolinowym, podstawnikiem benzyloaminowym lub fenyloaminowym powodowała spadek właściwości hamujących ( $IC_{50}$  6,5  $\mu$ M,  $IC_{50}$  12  $\mu$ M i  $IC_{50}$  14  $\mu$ M) wobec CK2 $\alpha$ . Jeszcze słabszymi inhibitorami okazały się pochodne z podstawnikiem 2-arylopirolidynowym, w obecności których enzym zachowywał 74-80% swojej aktywności.<sup>44</sup> Pochodne TBBi oraz TBBt z ugrupowaniem 5-arylotetrazolowym nie były inhibitorami kinazy białkowej CK2 [**H6**]. Niemniej jednak, związki te wykazywały cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych MCF-7 (gruczolak sutka) i CCRF-CEM (ostra białaczka limfoblastyczna), co wskazuje, że inne białko jest ich celem molekularnym. Do oceny właściwości cytotoksycznych tetrazolowych pochodnych TBBi i TBBt wykorzystano test aktywności metabolicznej MTT. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że pochodne TBBi wykazywały wyższą cytotoksyczność względem linii komórkowej CCRF-CEM niż MCF-7, zaś pochodne TBBt wykazywały silniejsze działanie przeciwnowotworowe wobec linii MCF-7. W obu przypadkach istotnymi czynnikami wpływającymi na przeżywalność komórek były struktura związku, jego stężenie oraz czas ekspozycji komórek na działanie badanego związku. Spośród tetrazolowych pochodnych benzimidazolu najwyższą aktywność cytotoksyczną wykazywały izomery 1,5-dwupodstawione **32a-d**. W zależności od podstawnika w pierścieniu benzenowym ugrupowania 5-arylotetrazolowego związki te w stężeniu 25  $\mu$ M (48 godzin inkubacji z komórkami) ograniczały przeżywalność komórek linii CCRF-CEM do 0-12%, zaś komórek linii MCF-7 do 22-45%. Na wartości te największy wpływ miał atom chloru, który w pozycji *para* pierścienia benzenowego ugrupowania 5-arylotetrazolowego obniżał aktywność cytotoksyczną związku **32c** wobec linii komórkowej CCRF-CEM, a w pozycji *orto* obniżał cytotoksyczność związku **32d** wobec linii komórkowej MCF-7. Efekt cytotoksyczny związków wzrastał wraz ze wzrostem ich stężenia. Przy stężeniu 50  $\mu$ M przeżywalność komórek linii CCRF-CEM była zerowa, zaś komórek linii MCF-7 na poziomie 16-29%. Analogiczną zależność można było zaobserwować w przypadku tetrazolowych pochodnych TBBt z tym, że związki te wykazywały znacznie niższą cytotoksyczność (przy stężeniu związku 50  $\mu$ M przeżywalność komórek linii CCRF-CEM była na poziomie 39-76%, a komórek linii MCF-7 na poziomie 3-58%). Kluczowym czynnikiem wpływającym na działanie cytotoksyczne pochodnych TBBt była także obecność atomu chloru w pierścieniu benzenowym fragmentu 5-arylotetrazolowego. W zależności od pozycji w pierścieniu podstawnik ten obniżał aktywność cytotoksyczną



związku (pozycja *orto*) lub podwyższał (pozycja *para*). W związku z powyższym w tej grupie pochodnych najwyższą aktywność cytotoksyczną względem obu badanych linii komórkowych wykazywał związek **30c** (z podstawnikiem 5-(4-chlorofenylo)-2*H*-tetrazol-2-ilowym). Zgodnie z założeniem większość otrzymanych związków wykazywała wyższą aktywność cytotoksyczną niż TBBi, TBBt oraz ich halogenoalkilowe pochodne (4,5,6,7-tetrabromo-1-(3-chloropropyl)-1*H*-benzimidazol i 4,5,6,7-tetrabromo-2-(3-chloropropyl)-2*H*-benzotriazol).

W związku z tym, że zsyntetyzowane przeze mnie rozbudowane przestrzennie pochodne TBBi (**29a-i**, **31a-d**, **32a-d**) oraz TBBt (**30a-d**) w niewielkim stopniu wpływały na aktywność podjednostki katalitycznej  $\alpha$  kinazy białkowej CK2 w dalszych badaniach skoncentrowałam się na syntezie mniej rozbudowanych strukturalnie cząsteczek, t.j. 4,5,6,7-tetrabromo-2-metylo-1*H*-benzimidazolu (2-Me-TBBi) oraz cyjanoalkilowych pochodnych TBBi i 2-Me-TBBi [**H7**]. Na podstawie opisanej w literaturze zasady „2-0”, zgodnie z którą skutecznymi inhibitorami kinaz są związki spełniające przynajmniej jeden z warunków:  $\Sigma(N_{\text{aro}})+\Sigma(\text{NH}_{\text{aro}})>2$  lub  $\Sigma(\text{Ar-NH})+\Sigma(\text{R-CN})>0$ <sup>45</sup> założyłam, że wprowadzenie ugrupowania cyjanoalkilowego w pozycję N1 pierścienia benzimidazolowego TBBi i 2-Me-TBBi doprowadzi do otrzymania nowych bardziej skutecznych i selektywnych inhibitorów CK2 niż TBBi. Za celowością syntezy 2-Me-TBBi oraz jego pochodnych dodatkowo przemawiał fakt, że grupa metylowa w pozycji C2 pierścienia benzimidazolowego zwiększy lipofilowość związków, dzięki czemu będą łatwiej przenikać przez błony komórkowe, co może mieć wpływ na ich właściwości cytotoksyczne. Struktury otrzymanych związków przedstawione zostały na Rysunku 3.



**Rysunek 3.** 2-Me-TBBi oraz cyjanoalkilowe pochodne TBBi i 2-Me-TBBi.

Syntezę 2-Me-TBBi prowadziłam w takich samych warunkach jak TBBi.<sup>43</sup> Pozostałe związki w zależności od długości łańcucha alkilowego otrzymałam w wyniku N-alkilowania

<sup>45</sup> A.M. Aronov, B. McClain, C. S. Moody, M.A. Murcko, 2008, Kinase-likeness and kinase-privileged fragments: toward virtual polypharmacology. *J. Med. Chem.* 51, 1214-1222.

TBBI oraz 2-Me-TBBI chloroacetonitrylem, 4-chlorobutyronitrylem lub 5-bromopentanonitrylem ( $n=1, 3, 4$ ), bądź w wyniku addycji Michaela TBBI lub 2-MeTBBI do akrylonitrylu ( $n=2$ ).

Badania biologiczne wykazały, że spośród zsyntetyzowanych związków najsilniejsze właściwości inhibitorowe wobec podjednostki  $\alpha$  kinazy CK2 wykazywał 2-Me-TBBI ( $K_i$   $1,11 \pm 0,30 \mu\text{M}$ ). Związek ten okazał się bardziej selektywnym inhibitorem niż TBBI, co potwierdziły badania przeprowadzone na panelu 8 innych kinaz. W przypadku cyjanoalkilowych pochodnych TBBI oraz 2-Me-TBBI istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność inhibitora była długość łańcucha alkilowego. Najsłabszymi inhibitorami były cyjanoetylowe pochodne TBBI i 2-Me-TBBI, zaś największy wpływ na aktywność CK2 $\alpha$  miał 4,5,6,7-tetrabromo-1-cyjanometylo-1*H*-benzimidazol **33a** ( $K_i$   $1,27 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ). Wszystkie związki wykazywały silne działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych linii CCRF-CEM oraz umiarkowane wobec komórek linii MCF-7. Większość otrzymanych pochodnych charakteryzowała się wyższą cytotoksycznością niż macierzysty TBBI. Najwyższą aktywność wykazywały 4,5,6,7-tetrabromo-1-cyjanometylo-1*H*-benzimidazol (**33a**), 2-Me-TBBI oraz 4,5,6,7-tetrabromo-1-cyjanometylo-2-metylo-1*H*-benzimidazol (**33b**) (w stężeniu  $20 \mu\text{M}$  ograniczały przeżywalność komórek linii CCRF-CEM do 14-28%, zaś linii MCF-7 do 36-65%). W związku z wyraźnym efektem cytotoksycznym zsyntetyzowanych związków wobec linii komórkowej CCRF-CEM metodą cytometrii przepływowej sprawdzono czy śmierć komórek nowotworowych następuje na drodze apoptozy czy nekrozy. Z przeprowadzonych badań wynika, że zsyntetyzowane związki w stężeniu  $10 \mu\text{M}$  wykazują zależne od struktury działanie proapoptotyczne. Obecność grupy metylowej w pozycji C2 pierścienia benzimidazolowego zwiększała działanie proapoptotyczne związków, zaś obecność podstawnika cyjanoalkilowego w pozycji N1 benzimidazolu wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego zmniejszała to działanie. Wyższa aktywność proapoptotyczna 2-Me-TBBI oraz jego pochodnych cyjanoalkilowych może wskazywać na łatwiejsze przenikanie tych związków przez błonę komórkową. Najwyższą aktywnością proapoptotyczną charakteryzowały się 2-Me-TBBI oraz 4,5,6,7-tetrabromo-1-cyjanometylo-2-metylo-1*H*-benzimidazol (**33b**). Związki te w stężeniu  $10 \mu\text{M}$  powodowały wejście na szlak apoptozy około 62% i 47% komórek, podczas gdy TBBI tylko 5,1% komórek. Wykazano także, że przeciwnowotworowe działanie najbardziej aktywnych związków, 2-Me-TBBI oraz pochodnych **33a-b**, związane jest z wewnątrzkomórkową inhibicją CK2.

Opisane badania oprócz aspektu praktycznego, polegającego na wydajnej syntezie nowej grupy związków, mają dużą wartość poznawczą. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat inhibitorów kinazy białkowej CK2 oraz dostarczają nowych informacji na temat aktywności przeciwnowotworowej pochodnych benzimidazolu.

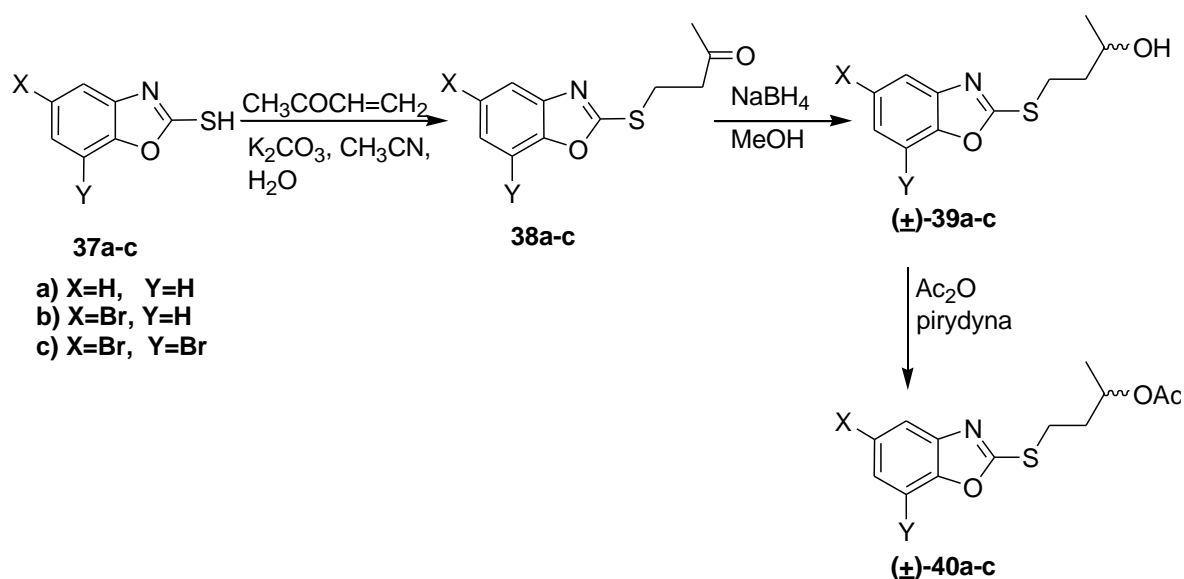
### **Chemoenzymatyczna synteza pochodnych benzoksazolu i ocena ich aktywności antymykobakteryjnej**

Kolejną grupą syntetyzowanych przeze mnie związków były chiralne pochodne benzoksazolu [H10]. Ugrupowanie benzoksazolowe podobnie jak pierścień tetrazolowy, benzimidazolowy oraz benzotriazolowy występuje w antybiotykach oraz związkach o działaniu przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym, przeciwbólowym, przeciwdepresyjnym, przeciwgrzybiczym oraz przeciwdrgawkowym (szczegółowy przegląd literatury zamieszczony został w publikacji [H10]). W ostatnich latach pochodnymi benzoksazolu zainteresowano się także w kontekście poszukiwania nowych leków tuberkulostatycznych. Wywoływana przez *Mycobacterium tuberculosis* gruźlica (TB) podobnie jak kandydoza stanowi poważny problem. Zgodnie z raportem World Health Organization (WHO) opublikowanym w 2018 choroba ta jest jedną z 10 głównych przyczyn śmierci. W roku 2017 dotknęła 10 mln ludzi, z czego 1,3 mln zmarło. Szacuje się, że około 23% populacji (1,7 miliarda ludzi) znajduje się w tzw. grupie ryzyka z powodu utajonej postaci infekcji, która w sprzyjających warunkach może przekształcić się w aktywną postać choroby.<sup>46</sup> Przyczyną tak dużej zapadalności i śmiertelności jest wzrost liczby szczepów wielolekoopornych MDR-TB (ang. multidrug-resistant tuberculosis), niewrażliwych na działanie co najmniej dwóch chemoterapeutyków pierwszego rzutu np. rifampicyny i izoniazydu. Skala problemu oraz zagrożenie epidemiologiczne, szczególnie w krajach słabo rozwiniętych, stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny oraz wskazuje potrzebę poszukiwania nowych środków antymykobakteryjnych.

Kontynuując swoje zainteresowanie aktywnymi biologicznie związkami z ugrupowaniem azolowym opracowałam chemoenzymatyczną metodę otrzymywania optycznie czynnych alkoholi oraz estrów z ugrupowaniem benzoksazolu. Syntezę ketonów **38a-c** oraz mieszanin racemicznych alkoholi ( $\pm$ )-**39a-c** i estrów ( $\pm$ )-**40a-c** ilustruje Schemat 9. Substraty **37a-c**

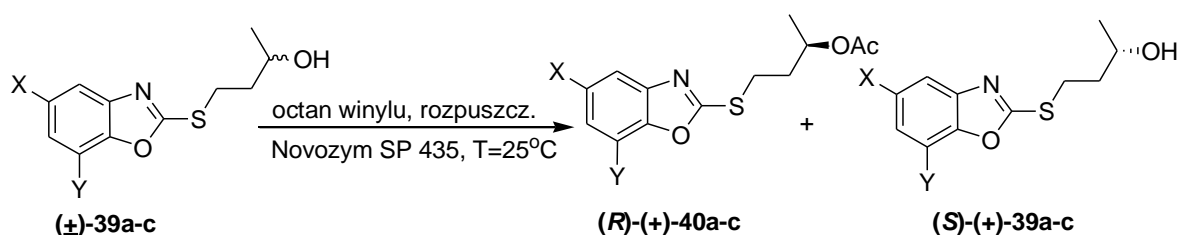
<sup>46</sup> Global tuberculosis report 2018, [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)

otrzymane były zgodnie z procedurami literaturowymi, co szczegółowo opisałam w pracy [H10].



**Schemat 9.** Synteza pochodnych benzoksazolu.

W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykazałam, że istnieje możliwość rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi oraz estrów z ugrupowaniem benzoksazolu w wyniku katalizowanych lipazami biotransformacji. Opracowałam dwie alternatywne metody otrzymywania optycznie czynnych pochodnych benzoksazolu. Pierwsza to katalizowana przez enzymy reakcja transestryfikacji octanu winylu alkoholami (±)-**39a-c** (Schemat 10).

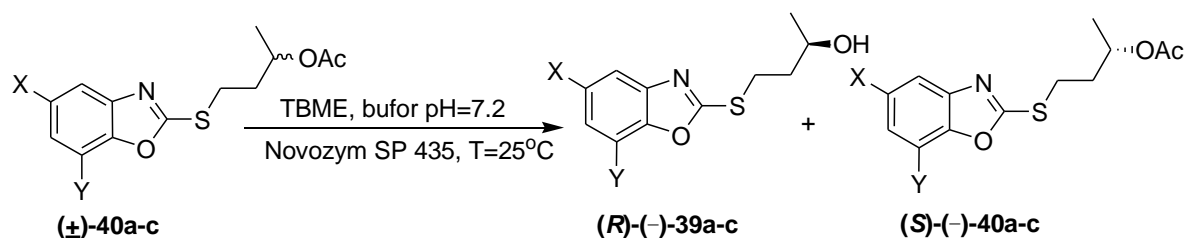


**Schemat 10.** Transestryfikacja enzymatyczna octanu winylu alkoholami z ugrupowaniem benzoksazolu.

Spośród testowanych lipaz: Amano AK, Amano PS, Amano PS-IM (lipaza immobilizowana na ziemi krzemkowej), Novozym SP 435 oraz Lipozym IM z *Mucor miehei* najbardziej enancjoselektywnym biokatalizatorem okazał się Novozym SP 435. Wykazałam, że na właściwości katalityczne Novozymu SP 435 wpływają rozpuszczalnik oraz budowa

substratu. W zależności od użytego medium reakcyjnego (eter *tert*-butyloowo-metylowy, toluen, eter dietylowy, eter diizopropylowy) enancjoselektywność reakcji (*E*) wynosiła od 4 do >100. Na podstawie analizy czystości optycznej produktów (*e.e.*) wykazałam, że optymalnymi rozpuszczalnikami były eter *tert*-butyloowo-metylowy oraz toluen (*e.e.* = 71-99%). Ponadto enancjoselektywność reakcji znacząco wzrastała po wprowadzeniu do pierścienia benzoksazolu jednego lub dwóch atomów bromu (*E*>100), co świadczy o lepszym dopasowaniu substratu do centrum aktywnego enzymu. Produktami reakcji były (*R*)-estry oraz pozostawały w mieszaninie nieprzereagowane (*S*)-alkohole. Metodą spektroskopii NMR z zastosowaniem chiralnego odczynnika derywatyzyjnego (enancjomeru (*R*) oraz (*S*) kwasu  $\alpha$ -metoksyfenylooctowego (MPA)<sup>21</sup>) określiłam konfigurację absolutną alkoholu (+)-**39c** (*e.e.*=99%). Konfigurację absolutną pozostałych alkoholi określiłam na podstawie porównania ich skręcalności właściwej z alkoholem (*S*)-(+)-**39c**. W związku z powyższym estry były (*R*)-enancjomerami.

Drugą opracowaną przeze mnie metodą otrzymywania optycznie czynnych pochodnych benzoksazolu była hydroliza enzymatyczna mieszanin racemicznych estrów ( $\pm$ )-**40a-c** prowadzona w układzie dwufazowym, w obecności Novozymu SP 435 (Schemat 11).



**Schemat 11.** Hydroliza enzymatyczna estrów z ugrupowaniem benzoksazolu.

Reakcje te charakteryzowały się wysoką enancjoselektywnością (*E*>100), dzięki czemu otrzymałam alkohole oraz estry o czystości optycznej 88-99%. Czynnikiem determinującym wartość stosunku enancjomerycznego, podobnie jak w przypadku reakcji transestryfikacji, była budowa substratu. Wprowadzenie jednego atomu bromu do pierścienia benzoksazolowego powodowało wzrost enancjoselektywności reakcji z *E*=192 do *E*=525, zaś wprowadzenie dwóch atomów bromu zwiększało enancjoselektywność reakcji do *E*=922.

Zsyntetyzowane ketony **38a-c**, mieszaniny racemiczne alkoholi ( $\pm$ )-**39a-c** oraz estrów ( $\pm$ )-**40a-c** zbadano pod kątem aktywności tuberkulostatycznej wobec szczepu standardowego *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 25618) i dwóch szczepów „dzikich”

izolowanych od pacjentów chorych na gruźlicę: szczepu Spec. 210 opornego na kwas *p*-aminosalicylowy, izoniazyd, rifampicynę oraz etambutol oraz szczepu Spec. 192 w pełni wrażliwego na wymienione farmaceutyki. Wyznaczone minimalne stężenia związków hamujące wzrost wyżej wymienionych szczepów (MIC) wynosiły 50 µg/mL lub 100 µg/mL, co w porównaniu z izoniazydem (MIC<3,1 µg/mL lub MIC<6,25 µg/mL) świadczy o ich słabej aktywności tuberkulostatycznej. Oceniono także aktywność przeciwdrobnoustrojową alkoholi (±)-**39a-c** wobec prątków niegruźliczych: *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478), *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC 19981), *Mycobacterium avium* (ATCC 15769), *Mycobacterium intracellulare* (ATCC 23434) oraz *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 13756). Względem większości szczepów związki wykazywały taką samą aktywność jak izoniazyd (MIC 50 µg/mL lub 100 µg/mL), zaś w przypadku szczepu *M. avium* okazały się cztery razy bardziej aktywne (MIC 12,5 µg/mL) niż izoniazyd (MIC 50 µg/mL). W celu sprawdzenia ewentualnego wpływu konfiguracji absolutnej związku na jego właściwości biologiczne oceniono również wrażliwość wszystkich wymienionych powyżej szczepów na enancjomery (*R*) i (*S*) alkoholu **39c**. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że budowa przestrzenna związku nie miała wpływu na jego właściwości antymykobakteryjne, gdyż uzyskane wartości MIC wobec wszystkich szczepów dla obu enancjomerów były takie same jak dla racematu.

### Podsumowanie

Przedłożony cykl publikacji obejmuje badania nad syntezą nowych pochodnych azotowych związków heterocyklicznych wykazujących aktywność przeciwgrzybiczą, przeciwnowotworową lub antymykobakteryjną. Uzyskane przeze mnie wyniki są istotne gdyż, rozszerzają aktualny stan wiedzy na temat syntezy i aktywności biologicznej pochodnych tetrazolu, benzimidazolu, benzotriazolu oraz benzoksazolu. Przeprowadzone badania dostarczają także informacji na temat zależności struktura chemiczna – aktywność biologiczna oraz możliwości wykorzystania katalizy enzymatycznej do otrzymywania optycznie czynnych pochodnych tetrazolu, benzimidazolu oraz benzoksazolu. Wiedza ta może być użyteczna przy projektowaniu i syntezie nowych substancji czynnych leków przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwnowotworowych. Opracowane przeze mnie procedury bazują na tanich i łatwo dostępnych odczynnikach oraz charakteryzują się szerokim zakresem stosowalności. W wyniku przeprowadzonych badań otrzymałam 128 nowych związków, z czego 86 związków wykazuje wysoką aktywność biologiczną:

przeciwgrzybiczą (63 związki), przeciwnowotworową (18 związków) oraz antymykobakteryjną (3 związki). Dla każdej grupy syntetyzowanych związków wskazałam optymalne warunki syntezy. Moim znaczącym wkładem w rozwój dyscypliny naukowej - chemia było:

- opracowanie, po raz pierwszy, warunków enzymatycznego kinetycznego rozdzielania mieszanin racemicznych alkoholi oraz estrów z ugrupowaniem tetrazolu,
- opracowanie, po raz pierwszy, dwóch enancjoróżnicujących metod otrzymywania optycznie czynnych alkoholi oraz estrów z podstawnikiem benzoksazolowym,
- wykazanie, że katalizowane przez lipazy reakcje transestryfikacji są skutecznym narzędziem do otrzymania optycznie czynnych *N*-podstawionych pochodnych benzimidazolu,
- zoptymalizowanie warunków *N*-alkilowania 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu 1-bromo-3-chloropropanem (zaproponowana procedura ma charakter ogólny i może być stosowana na szerszą skalę do wprowadzania fragmentu chloropropylowego do innych azotowych związków heterocyklicznych, czego dowodem są przeprowadzone w tych warunkach reakcje *N*-alkilowania 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolu oraz 5-arylotetrazoli),
- wykazanie, że wydajnym sposobem na *S*-alkilowanie 2-sulfanylobenzoksazolu oraz 2-sulfanylobenzotiazolu 1-bromo-3-chloropropanem jest prowadzenie reakcji w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego (PTC),
- wykazanie, że pochodne tetrazolu wykazują wysoką aktywność przeciwgrzybiczą wobec drożdży *C. albicans* oraz wskazanie struktur, które w perspektywie mogą znaleźć zastosowanie jako antymikotyki (octan (+)-1-[5-(2-chlorofenylo)-2*H*-tetrazol-2-ilo]propan-2-olu ((+)-**7d**), 3-(5-fenylo-2*H*-tetrazol-2-ilo)propionian etylu (**9a**), dwie pochodne tetrazolu z ugrupowaniem benzoksazolu **16c** i **16d** oraz trzy pochodne tetrazolu z ugrupowaniem piperolidyny **20aA**, **20aC**, **20cD**),
- wykazanie, że pochodne tetrazolu **9a**, **20aA** oraz **20cD** skutecznie hamują infekcje o etiologii *Candida* spp. u owadów *G. mellonella*, co może mieć znaczenie kliniczne i przyczynić się do postępu w zakresie poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych,
- otrzymanie nowych alkoholi z ugrupowaniem benzoksazolu, które wykazują cztery razy wyższą aktywność antymykobakteryjną względem szczepu *M. avium* niż stosowany

lek-izoniazyd oraz są tak samo aktywne jak izoniazyd wobec prątków *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* oraz *M. fortuitum*,

- otrzymanie nowych inhibitorów kinazy białkowej CK2 (4,5,6,7-tetrabromo-2-metylo-1*H*-benzimidazolu oraz 4,5,6,7-tetrabromo-1-cyjanometylo-2-metylo-1*H*-benzimidazolu), które wykazują działanie proapoptotyczne, co czyni je interesującymi strukturami wiodącymi w poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków onkologicznych,
- wykazanie, że ważnym fragmentem strukturalnym wpływającym na aktywność przeciwgrzybiczą pochodnych 5-arylotetrazolu jest podstawnik 2-chlorofenyłowy oraz 4-chlorofenyłowy (wiedza ta może być przydatna w racjonalnym projektowaniu nowych, potencjalnych leków przeciwgrzybiczych),
- wykazanie, że ugrupowanie 5-arylotetrazolowe zwiększa aktywność cytotoksyczną pochodnych 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu oraz 4,5,6,7-tetrabromo-2*H*-benzotriazolu względem komórek nowotworowych linii CCRF-CEM oraz MCF-7.

Uzyskane wyniki badań opublikowałam w 11 artykułach w czasopismach z listy filadelfijskiej. Badania realizowałam w ramach:

- prac statutowych Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej,
- projektu badawczego nr POIG.01.03.01-00-158/09 „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”, okres realizacji 01.01.2010-30.06.2015 (koordynator projektu Politechnika Wroclawska),
- projektu badawczego NCN nr 2011/01/B/ST5/00849 „Badanie mechanizmów inhibicji kinazy kazeinowej” okres realizacji 01.12.2011-30.09.2014 (kierownik projektu prof. Maria Bretner).

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)**

### **5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych**

W roku 2003 w ramach programu edukacyjnego Socrates odbyłam 3-miesięczny staż w placówce Paris-Sud XI University (Orsay Institute of Molecular Chemistry and Materials), gdzie pod kierunkiem prof. Jean-Pierre Mahy badałam właściwości katalityczne przeciwciał monoklonalnych w reakcjach utleniania. Uzyskane przeze mnie oraz zespół, z którym pracowałam wyniki zostały opublikowane w pracy **P1**.



W tym samym roku (2003) podjęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, w Zakładzie Technologii i Biotechnologii Środków Lecznicych i Kosmetyków. Prace badawcze prowadziłam pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Jana Plenkwicza. Dotyczyły one syntezy optycznie czynnych  $\beta$ -hydroksytiocyjanianów z zastosowaniem katalizy enzymatycznej i ich przekształcania w tiirany. W wyniku przeprowadzonych badań opracowałam metodę syntezy octanów tiocyjanianohydryn oraz  $\alpha$ -tiocyjanianoketonów, opracowałam dwie metody otrzymywania optycznie czynnych  $\beta$ -hydroksytiocyjanianów (enzymatyczny rozdział mieszanin racemicznych wymienionych estrów oraz mikrobiologiczna redukcja prochiralnych  $\alpha$ -tiocyjanianoketonów) oraz metodę otrzymywania optycznie czynnych tiiranów. Efektem tych prac była rozprawa doktorska, która decyzją Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej została wyróżniona oraz cztery publikacje (**P2**, **P3**, **P4**, **P5**), z czego jedna (**P5**) została opublikowana po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

### **5.1. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych**

Prace badawcze, które prowadzę po uzyskaniu stopnia naukowego doktora związane są z opracowywaniem metod syntezy nowych związków, które wykazują aktywność biologiczną lub mogą być wykorzystywane w syntezie związków biologicznie aktywnych. Jednocześnie prowadzę badania nad możliwością wykorzystania biotransformacji do syntezy związków optycznie czynnych. Obiektem moich zainteresowań są związki heterocykliczne o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej, przeciwbakteryjnej oraz przeciwnowotworowej. Tematyka ta przede wszystkim związana jest z jednotematycznym cyklem publikacji, który przedstawiłam jako swoje osiągnięcie naukowe. Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora stanowi 16 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Jedenaście prac (**[H1]-[H11]**) stanowi jednotematyczny cykl publikacji, jedna praca związana jest z tematyką, którą realizowałam w ramach studiów doktoranckich (**P5**), zaś pozostałe prace dotyczą syntezy inhibitorów kinaz serynowo – treoninowych (**P6**, **P7**), synergistycznego oddziaływania inhibitorów kinazy białkowej CK2 z 5-fluorouracylem – prekursorem inhibitora syntazy tymidylanowej (**P8**) oraz syntezy halogenowych pochodnych benzimidazolu/benzotriazolu i oceny ich właściwości fizykochemicznych (**P9**). Prowadzę także badania nad syntezą związków z ugrupowaniem benzodiazepiny. Struktury, które dotychczas otrzymałam wykazują wysoką aktywność grzybobójczą oraz hamują

rozwój infekcji o etiologii *Candida* spp. u bezkręgowców (aktualnie przygotowuję manuskrypt).

Zajmuję się również syntezą sulfonów z ugrupowaniem benzimidazolu. Związki te będą badane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej.

Interdyscyplinarny charakter badań, które prowadzę wymagał nawiązania współpracy z innymi ośrodkami badawczymi takimi jak: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Narodowy Instytut Leków, Zakład Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Badania te realizowałam i realizuję w ramach prac statutowych Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej oraz projektów badawczych. Poza dwoma projektami wymienionymi w punkcie 4 jestem także jednym z wykonawców projektu kierowanego przez prof. M. Bretner pt. „Badanie synergistycznego hamowania proliferacji komórek nowotworowych przez inhibitory kinazy kazeinowej CK2 oraz inhibitory szlaku syntezy tymidylanu” (grant NCN nr 2014/13/B/NZ7/02273).

## 6. Przyszłe cele badawcze

W ramach dalszej pracy naukowej zamierzam zająć się syntezą nowych związków wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Obiektem moich badań będą związki hamujące jednocześnie aktywność kinazy białkowej CK2 oraz kinazy PIM-1 tzw. dualne inhibitory. Związki te hamowałyby jednocześnie kilka szlaków metabolicznych, efektem czego byłoby silniejsze działanie przeciwnowotworowe. Przy projektowaniu nowych dualnych inhibitorów zamierzam wykorzystać metody modelowania molekularnego. Aby zrealizować ten cel planuję aplikować o projekt badawczy. Zamierzam także kontynuować badania dotyczące związków z ugrupowaniem tetrazolu oraz benzodiazepiny w celu otrzymania nowych, bardziej aktywnych środków przeciwgrzybiczych. Celem moich dalszych badań będzie także poszukiwanie nowych związków wykazujących aktywność przeciwgruźliczą. Ponadto zamierzam kontynuować badania nad możliwością stosowania biotransformacji w syntezie organicznej.

*Edyta Łukowska-Chojnacka*