



AUTOREFERAT

Omówienie cyklu publikacji pt.

SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA NOWYCH POCHODNYCH AZOTOWYCH ZWIĄZKÓW HETEROCYKLICZNYCH I ICH ANALOGÓW

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Katarzyna Gobis

Gdańsk, 2013

1. Imię i nazwisko: Katarzyna Gobis

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

W latach 1990-1995 studiowałam na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, na kierunku Biotechnologia. W roku 1995 obroniłam pracę magisterską pt. *„Badanie roli czynników struktury związków przeciwnowotworowych z grupy pochodnych i analogów antrachinonu w generowaniu wolnych rodników tlenowych”*, którą przygotowałam w Katedrze Technologii Leków i Biochemii pod kierunkiem dr inż. Jolanty Tarasiuk. W październiku tego samego roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym PG, pod opieką prof. dr inż. Edwarda Borowskiego i dr inż. Jolanty Tarasiuk, która po uzyskaniu stopnia naukowego doktora habilitowanego ostatecznie została promotorem mojej pracy doktorskiej. Rozprawę pt. *„Badania mechanizmów odpowiedzialnych za wysoką aktywność cytotoksyczną benzoperimidyn i pirymidoakrydonów w stosunku do komórek nowotworowych o oporności wielolekowej związanej z nadekspresją białek transportujących ABC”* obroniłam 4 października 2000 r. uzyskując stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie chemii.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Po ukończeniu studium doktoranckiego i uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk chemicznych, 1.12.2000 r. zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) na stanowisku adiunkta, gdzie pracuję do chwili obecnej.

4. Osiągnięcia wynikające 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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Przedmiotem prezentowanych osiągnięć naukowych była synteza, charakterystyka i aktywność przeciwbakteryjna, zwłaszcza przeciwgruźlicza, nowych pochodnych z grupy azotowych związków heterocyklicznych. Do badań włączone

zostały także pochodne kwasu benzoilokarbonohydrazonoditiowego niebędące związkami heterocyklicznymi, lecz stanowiące grupę ich analogów. Wyniki badań opisane zostały w postaci monotematycznego cyklu wymienionych poniżej prac, opublikowanych w latach 2006-2013, o łącznym współczynniku oddziaływania IF **17,466** i wartości punktacji MNiSW **278**.

1. **Gobis K**, Foks H, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E: Synthesis and Tuberculostatic Activity of Novel 1,2,4-Triazoles Obtained from Heterocyclic Carbohydrazides (2010) *Heterocycles* 81 (4) 917-934 (IF = 1,093; MNiSW = 20).
2. **Gobis K**, Foks H, Augustynowicz-Kopec E, Napiórkowska A: Synthesis and Tuberculostatic Activity of Novel Diverse Heterocyclic Compounds Derived from Heterocyclic Carbohydrazides and Methyl 2-Heteroaroylhydrazinecarbodithioates (2012) *Heterocycles* 85 (4) 871-885 (IF = 0,999; MNiSW = 20).
3. **Gobis K**, Foks H, Augustynowicz-Kopec E, Napiórkowska A: Synthesis, Characterization, and Tuberculostatic Activity of Novel Heterocyclic Compounds Derived from Dimethyl Heteroaroylcarbonohydrazone dithioates (2012) *Heterocycles* 85 (9) 2269-2280 (IF = 0,999; MNiSW = 20).
4. **Gobis K**, Foks H, Żuralska A, Kędzia A: Studies on Pyrazine Derivatives. XLIX. Synthesis and Antibacterial Activity of 6-Methoxypyrazine-2-carboxylic Acid Hydrazide Derivatives (2006) *Heterocycles* 68 (12) 2615-2625 (IF = 1,077; MNiSW 15).
5. **Gobis K**, Foks H, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E, Głowska ML, Olczak A, Sabisz M: Synthesis, Structure, and Tuberculostatic Activity of Dimethyl Benzoylcarbonohydrazone dithioates (2011) *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 142 (11) 1137-1142 (IF = 1,532; MNiSW = 27).
6. **Gobis K**, Foks H, Augustynowicz-Kopec E, Napiórkowska A, Szczesio M, Olczak A, Głowska ML: Synthesis, Characterization, and Tuberculostatic Activity of Novel 2-(4-Nitrobenzoyl)hydrazinecarbodithioic Acid Derivatives (2012) *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 143 (4) 607-617 (IF = 1,532; MNiSW = 25).
7. **Gobis K**, Foks H, Kędzia A, Wierzbowska M, Kwapisz E, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E: Studies on Pyrazine Derivatives. XLVII. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Pyrazine Derivatives with Amidoxime

- Moiety (2006) *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 63 (1) 39-40 (MNiSW = 6).
8. **Gobis K**, Foks H, Kędzia A, Wierzbowska M, Zwolska Z: Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Pyridine and Pyrazine Derivatives Obtained from Amidoximes (2009) *Journal of Heterocyclic Chemistry* 46 (6) 1271-1279 (IF = 1,009; MNiSW = 20).
 9. **Gobis K**, Foks H, Wiśniewska K, Dąbrowska-Szponar M, Augustynowicz-Kopeć E, Napiórkowska A, Sikorski A: Synthesis, Structure, and Antimicrobial Activity of Heterocyclic Phenylsulfonyl- and 4-Aminophenylsulfonyl-carboximidamides (2012) *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* (2012) 143 (8) 1161–1169 (IF = 1,532; MNiSW = 25).
 10. **Gobis K**, Foks H, Wiśniewska K, Dąbrowska-Szponar M, Augustynowicz-Kopeć E, Napiórkowska A: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Heterocyclic Sulfamoyl-phenyl-carboximidamides Derived from Clinically Applied Sulfonamides (2012) *Archiv der Pharmazie* 345 (11) 911-917 (IF = 1,708; MNiSW = 20).
 11. **Gobis K**, Foks H, Sławiński J, Sikorski A, Trzybiński D, Augustynowicz-Kopeć E, Napiórkowska A, Bojanowski K: Synthesis and Biological Activity of Novel Heterocyclic Sulfonyl-carboximidamides (2013) *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 144, doi: 10.1007/s00706-012-0888-0 (IF = 1,532; MNiSW = 25).
 12. **Gobis K**, Foks H, Sławiński J, Augustynowicz-Kopeć E, Napiórkowska A: Synthesis and Biological Activity of Novel 3-Heteroaryl-2H-pyrido[4,3-*e*][1,2,4]thiadiazine and 3-Heteroaryl-2H-benzo[*e*][1,2,4]thiadiazine 1,1-Dioxides (2013) *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 144, doi: 10.1007/s00706-013-0988-5 (IF = 1,532; MNiSW = 25).
 13. **Gobis K**, Foks H, Bojanowski K, Augustynowicz-Kopeć E, Napiórkowska A: Synthesis of Novel 3-Cyclohexylpropanoic Acid-derived Nitrogen Heterocyclic Compounds and Their Evaluation for Tuberculostatic Activity (2012) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20 (1) 137-144 (IF = 2,921; MNiSW = 30).

Wprowadzenie

Badania nad syntezą nowych pochodnych z grupy azotowych związków heterocyklicznych aktywnych wobec bakteryjnych szczepów patogennych podjęłam w związku z pojawieniem się i narastaniem liczby zakażeń opornych na stosowane chemoterapeutyki¹. Przyczyn tego zjawiska upatruje się w niewłaściwie prowadzonej diagnostyce i leczeniu oraz niekontrolowanym odstawieniu leków przez pacjenta po ustaniu objawów infekcji. Działania takie prowadzą do powstania zmutowanych szczepów opornych na chemoterapeutyki². Przykładem mogą być oporne na metycylinę szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA), oporne na wankomycynę szczepy z rodzaju *Enterococcus* (VRE)³, szczepy *Legionella pneumophila* oporne na fluorochinolony czy erytromycynę⁴ oraz oporne na azole szczepy z rodzaju *Candida*⁵. Terapia infekcji przez nie wywołanych jest dłuższa i wymaga zwykle zastosowania kombinacji różnych leków, co zwiększa ryzyko wystąpienia nasilonych objawów ubocznych oraz zakażeń wtórnych⁶.

Szczególnym przypadkiem choroby infekcyjnej jest gruźlica wywoływana przez *Mycobacterium tuberculosis*. Zajmuje ona wiodące miejsce w raportach o zapadalności oraz śmiertelności populacji światowej. W 1990 roku odnotowano >6 mln nowych zachorowań, a w 2007 liczba ta wzrosła do 9,2 mln⁷. Szacuje się, że w latach 2000-2020 ok. 1 mld osób na świecie zostanie zakażonych, z czego 20% zachoruje na postać aktywną, zaś 4% umrze z jej powodu⁸. Jako przyczyny globalnego zagrożenia prątkiem wymienia się wzrost liczby nowych szczepów wielolekoopornych MDR-TB (ang. multidrug-resistant tuberculosis), wykazujących oporność wobec przynajmniej dwóch chemoterapeutyków pierwszego rzutu, izoniazydu i rifampicyny⁹. Oporność wielolekowa jest wynikiem stopniowego sumowania się niezależnych mutacji w genach kodujących miejsca docelowe dla poszczególnych leków¹⁰. Szczególnie groźnym zjawiskiem wydaje się być XDR-TB (ang. extensively drug-resistant tuberculosis), którego prawdziwa skala nie jest znana. Definiuje się je, jako oporność na leki pierwszego rzutu, rifampicynę i izoniazyd, przedstawiciela grupy chinolonów

¹ R. Gomez-Lus, A. Clavel, J. Castillo, C. Seral, C. Rubio, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 16, 335–339.

² R. E. Jsturz, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, 36, S19–S22.

³ L. B. Rice, *Am. J. Infect. Control* 2006, 34, S11–S19.

⁴ D. Jonas, I. Engels, D. Hartung, J. Beyesmann, U. Frank, F. D. Dascher, *J. Antimicrob. Chemoth.* 2002, 51, 275–280.

⁵ M. H. Miceli, J. A. Diaz, S. A. Lee, *Lancet Infect. Dis.* 2011, 11, 142–151.

⁶ C. Jernberg, S. Löfmark, C. Edlund, J. K. Jansson, *Microbiology* 2010, 156, 3216–3223.

⁷ World Health Organization, Global Tuberculosis Report 2012; http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf

⁸ T. Burki, *Lancet Infect. Dis.* 2010, 10 297–298.

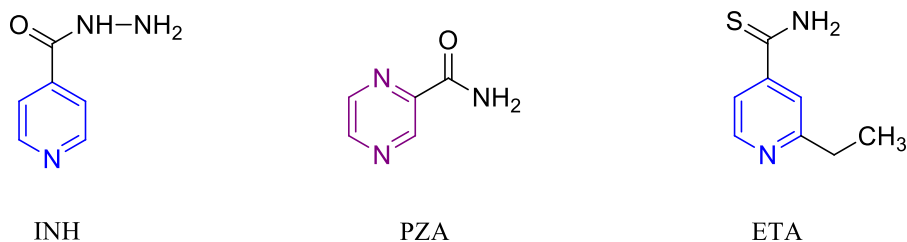
⁹ T. Dalton, P. Cegielski, S. Akksilp, L. Asencios, J. C. Caoili, S. N. Cho, V. V. Erokhin, J. Ershova, M. T. Gler, B. Y. Kazenny, H. J. Kim, K. Kliiman, E. Kubatova, C. Kvasnovsky, V. Leimane, M. Van der Walt, L.E. Via, G. V. Volchenkov, M. A. Yagui, H. Kang, *Lancet* 2012, 380, 1406–1417.

¹⁰ S. Morris, G. H. Bai, P. Suffys, L. Portillo-Gomez, M. Fairchok, D. Rouse, *J. Infect. Dis.* 1995, 171, 954–960.

i przynajmniej jednego z podawanych dożylnie leków drugiego rzutu, kanamycyny, kapreomycyny lub amikacyny¹¹. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej wymaga długiego okresu, a wyleczenie uzyskuje się jedynie u 52% chorych nowo wykrytych, a wśród chorych wcześniej leczonych zaledwie u 29%¹².

Oporne szczepy mikroorganizmów patogennych są poważnym zagrożeniem szczególnie dla pacjentów z obniżoną odpornością, a zakażenia przez nie wywołane są najczęstszym powikłaniem u osób stosujących leki immunosupresyjne oraz HIV-pozytywnych. Gruźlica jest jednym z zakażeń oportunistycznych u chorych na AIDS. Obniżenie odporności zwiększa podatność zachorowań nawet do 50%. W 2007 roku odnotowano ok. 1,3 mln przypadków gruźlicy u chorych seropozytywnych, z czego 33% zakażonych zmarło¹³.

Pojawienie się szczepów opornych stworzyło pilne zapotrzebowanie na bardziej skuteczne i bezpieczne leki przeciwdrobnoustrojowe. Zwłaszcza, że w przypadku gruźlicy istnieje niewielka liczba skutecznych chemoterapeutyków. Wśród czołowych leków wymienić należy izoniazyd (INH)¹⁴, pirazynamid (PZA)¹⁵, etionamid (ETA)¹⁶ (Rysunek 1). Niestety, najbardziej skuteczne chemoterapeutyki, podobnie jak stosowane antybiotyki, np. rifampicyna (RMP), wywołują cały szereg poważnych efektów ubocznych, jak hepatotoksyczność, neurotoksyczność, ostre zapalenie trzustki i reakcje nadwrażliwości^{17,18}.



Rysunek 1. Stuktury izoniazydu, pirazynamidu i etionamidu

¹¹ World Health Organisation 2006, Press release: "WHO Global Task Force outlines measures to combat XDR-TB worldwide"; <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np29/en/index.html>

¹² G.B. Migliori, M. D'Arcy Richardson, G. Sotgiu, C. Lange, *Clin. Chest Med.* 2009, 30, 637-665.

¹³ J.B. Nachega, G. Maartens, Clinical aspects of tuberculosis in HIV-infected adults; *Tuberculosis. A Comprehensive Clinical Reference*, Saunders-Elsevier 2009, pp. 524-531.

¹⁴ Isoniazid, *Tuberculosis* 2008, 88, 112-116.

¹⁵ Pyrazinamide, *Tuberculosis* 2008, 88, 141-144.

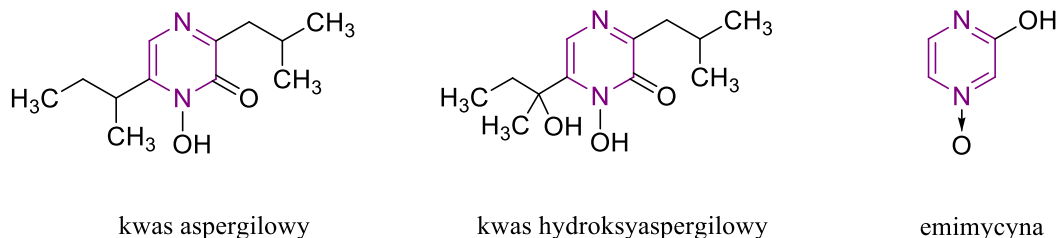
¹⁶ Ethionamide, *Tuberculosis* 2008, 88, 106-108.

¹⁷ N.H. Chan-Tamkins, *Clin. Dermatol.* 1995, 13, 223-233.

¹⁸ H. Izzedine, V. Launay-Vacher, T. Storme, G. Deray, *Am. J. Gastroenterol.* 2001, 96, 3208-3209.

Istnieje kilka strategii poszukiwania nowych chemoterapeutyków¹⁹. Często prowadzi się badania wśród zupełnie nowych grupy chemicznych, których kierunek działania związany jest z nowymi celami molekularnymi. Ta metoda wymaga uprzedniego dokładnego poznania nowego celu, z którym potencjalny chemoterapeutyk ma oddziaływać. Inny sposób polega na strukturalnej modyfikacji znanych leków przeciwdrobnoustrojowych, tzw. struktur wiodących, w celu zwiększenia ich powinowactwa do celu molekularnego i rozszerzenia spektrum substratowego²⁰. W tym przypadku w jednej cząsteczce są ze sobą łączone różne aktywne fragmenty strukturalne, z których każdy oddziałuje w sposób niezależny z odpowiednim celem molekularnym²¹. W ten sposób można uzyskać podwójne lub nawet synergistyczne działanie leku. Stwarza to szansę na przewyższenie obecnie istniejącej oporności i zahamowanie zjawiska powstawania nowych szczepów opornych²².

W grupie pochodnych pirazyny znaleziono szereg substancji o aktywności przeciwbakteryjnej. Można tu wymienić substancje pochodzenia naturalnego, jak kwas aspergilowy i hydroksyaspergilowy izolowane z kultur *Aspergillus flavus*²³, czy emimycyna (pirazynol) ze *Streptomyces griseochromogenes*²⁴ (Rysunek 2).



Rysunek 2. Struktury naturalnych pochodnych pirazyny aktywnych przeciwbakteryjnie

Otrzymano także całą grupę substancji syntetycznych o aktywności przeciwbakteryjnej, zawierających azotowe sześciocłonowe pierścienie heterocykliczne pirydyny, np. heterocykliczne pochodne lizenolidu²⁵ oraz pochodne 3-cyjanopirydyny²⁶ (Rysunek 3). Wartości MIC uzyskane dla tych związków wobec

¹⁹ C. G. Wermuth, Chapter 6-Strategies in the Search of New Lead Compounds or Original Working Hypotheses, *The Practice of Medicinal Chemistry* 2008, Third Edition, Elsevier, pp. 123, 125-143.

²⁰ Y.-T. Tan, D. J. Tillett, J. A. McKay, *Mol. Med. Today* 2000, 6, 309-314.

²¹ J. B. Bremner, J. I. Ambrus, S. Samorsorn, *Curr. Med. Chem.* 2007, 14, 1459-1477.

²² C. Hubschwerlen, J. L. Specklin, C. Sigwalt, S. Schroeder, H. H. Locker, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2313-2319.

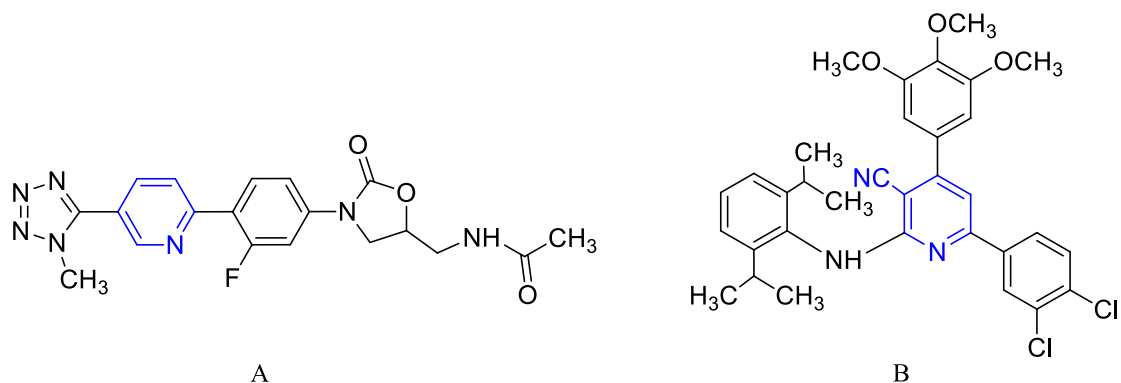
²³ E. White, H. Hill, *J. Bacteriol.* 1943, 45, 433-443.

²⁴ M. Tarao, K. Kurasawa, N. Tanaka, H. Yonehara, H. Umezawa, *J. Antibiot. Ser. A* 1960, 13, 401-405.

²⁵ Y. W. Jo, W. B. Im, J. K. Rhee, M. J. Shim, W. B. Kim, E. C. Choi, *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 5909-5915.

²⁶ A. A.-M. Abdel-Aziz, H. I. El-Subbagh, T. Kuniada, *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 4929-4935.

niektórych opornych szczepów patogennych wyniosły odpowiednio 0,2-3,13 $\mu\text{g/ml}$ i 3,2-7,0 $\mu\text{g/ml}$.



Rysunek 3. Struktury syntetycznych pochodnych pirydyny aktywnych przeciwbakteryjnie:
A – pochodna linezolidu, B – pochodna cyjanopirydyny

Poszukując aktywnych przeciwbakteryjnie sulfonamidów kolejnych generacji zwrócono również uwagę w kierunku związków heterocyklicznych. Otrzymano m.in. stosowane klinicznie sulfonamidowe pochodne pirymidyny, sulfamerazynę i sulfametazynę (Rysunek 4)²⁷.



Rysunek 4. Struktury sulfamerazyny i sulfametazyny

Stosowane leki przeciwgruźlicze, INH, PZA, ETA, także posiadają w swojej strukturze heterocykliczne pierścienie pirydyny i pirazyny. Z tego powodu właśnie w tej grupie poszukuje się potencjalnych leków przeciwbakteryjnych, w tym również przeciwgruźliczych.

Komisja Europejska w 2011 r. przedstawiła plan przeciwdziałania wzrastającemu zagrożeniu opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe. Plan ten zawiera 12 działań na rzecz wdrażania w krajach członkowskich UE i identyfikuje 7 obszarów, w których nakłady finansowe są najbardziej konieczne. Jednym z takich obszarów jest

²⁷ Y. L. Hong, P. A. Hossler, D. H. Calhoun, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39,1756-1763.

opracowanie nowych skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych lub alternatyw dla terapii przeciwdrobnoustrojowej²⁸.

Cel badań

Podstawowym celem moich badań, przedstawionych w 13 publikacjach [1-13], była synteza nowych pochodnych z grupy azotowych związków heterocyklicznych: pirydyny, pirazyny, pirymidyny, chinoliny i benzimidazolu, o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej, szczególnie przeciwgruźliczej. Syntezy zaplanowałam w taki sposób, aby wśród otrzymanych związków znalazły się pochodne zawierające w swojej strukturze wymienione układy heterocykliczne połączone z fragmentami strukturalnymi, których aktywność została wcześniej dowiedziona. Kolejnym celem było przeprowadzenie dla substancji aktywnych analizy zależności struktura – aktywność oraz poznanie elementów ich struktury odpowiedzialnych za działanie wobec bakterii patogennych. Badaniami objęłam:

- I. związki heterocykliczne otrzymane z hydrazydów i metylohydrazydów kwasów heteroarylokarboksylowych, w tym 1,3,4-oksadiazole, 1,3,4-tiadiazole, 1,2,4-triazole, triazolo[3,4-*b*][1,3]tiazyny oraz 5,6,7,8-tetrahydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pirymidyny [1-4], pochodne kwasu heteroaroilohydrazynokarboditiowego i heteroaroilokarbonohydrazonoditiowego oraz kwasu benzoilohydrazynokarboditiowego i benzoilokarbonohydrazonoditiowego [1-6],
- II. związki heterocykliczne otrzymane z karbonitryli, w tym amidoksymy oraz syntetyzowane z nich oksymy i 1,2,4-oksadiazole [7,8], a także iminoestry oraz pochodne amidynowe i sulfonamidynowe [9-12],
- III. benzimidazole i ich analogi (naftoimidazol, imidazopirydyna, imidazofenazyna) otrzymywane z 1,2-diamin aromatycznych i hetroaromatycznych [13].

Związkami wyjściowymi do przeprowadzonych przeze mnie syntez I etapu badań były heterocykliczne karbohydrazydy i metylokarbohydrazydy. Związki te otrzymałam z estrów metylowych odpowiednich kwasów karboksylowych w wyniku typowych reakcji opisanych w piśmiennictwie chemicznym^{29,30}. Jako związki wyjściowe wybrałam kwas pikolinowy, nikotynowy, izonikotynowy, pirazyno-2-karboksylowy,

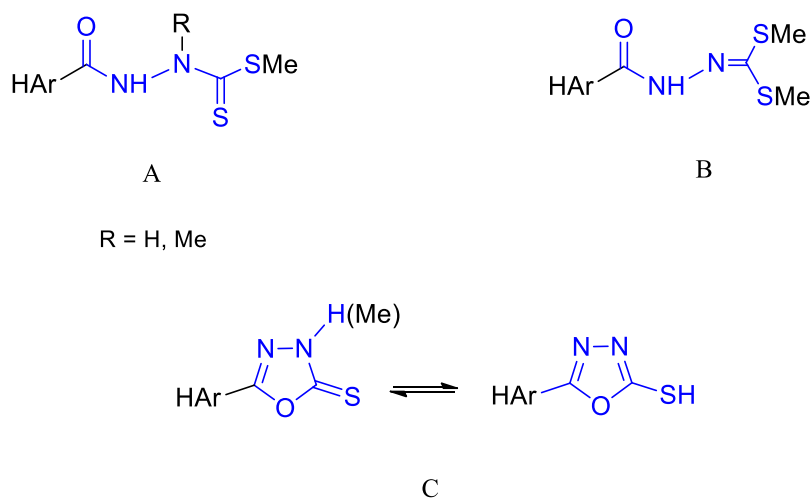
²⁸ European Commission; http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/policy/index_en.htm

²⁹ H. Foks, J. Sawlewicz, *Acta Polon. Pharm.* 1964, 21, 429-436.

³⁰ D. Pancechowska-Ksepko, H. Foks, M. Janowiec, Z. Zwolska-Kwiec, *Acta Polon. Pharm.* 1988, 45, 193-200.

pirymidyno-2-karboksylowy, chinolino-2-karboksylowy, a także 1-tlenek 3-karboksypirydyny, 1-tlenek 4-karboksypirydyny, 1-tlenek 3-karboksypirazyny oraz 6-chloropirazyno-2-karbonitryl. Taki wybór substratów miał zapewnić zróżnicowanie strukturalne produktów i w perspektywie umożliwić analizę zależności struktura – aktywność.

Odpowiednie *S*-estry, heteroaroiłohydrazynokarboditiany metylu (*Rysunek 5*, struktura A), otrzymałam w wyniku działania disiarczkiem węgla i siarczanem dimetylu w roztworze wodno – etanolowym wodorotlenku potasu (dla hydrazydów) lub w etanolowym roztworze trietyloaminy (TEA) (dla metylohydazydów) [1,4]. Reakcje prowadziłam w temperaturze pokojowej. Użycie dwukrotnego nadmiaru jodku metylu jako czynnika metylującego prowadziło natomiast do otrzymania *S,S'*-diestrów, odpowiednich heteroaroiłokarbonohydrazonoditianów dimetylu (*Rysunek 5*, struktura B) [3,4]. Zastosowanie w miejsce czynnika metylującego równomolowej ilości dwufunkcyjnego środka alkilującego, np. 1,2-dibromoetanu, prowadziło do otrzymania odpowiedniego *S,S'*-diestru cyklicznego, 1,3-ditiolanu [4]. Natomiast ogrzewanie substratów w temperaturze wrzenia z disiarczkiem węgla w środowisku alkalicznym bez czynnika metylującego prowadziło do cyklizacji z utworzeniem odpowiednich 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionów (*Rysunek 5*, struktura C) [2,4].

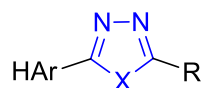


*Rysunek 5. Struktury otrzymanych pochodnych: A - heteroaroiłohydrazynokarboditianów metylu, B - heteroaroiłokarbonohydrazonoditianów dimetylu, C - 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionów*

W widmie ^1H NMR dla pochodnej 6-metoksypirazynowej zaobserwowałam podwójne sygnały odpowiadające protonom układu pirazynowego. To spostrzeżenie

dowodzi obecności dwóch odmian tautomerycznych tego związku, tionowej i tiolowej [4].

Zastosowanie środowiska stężonego kwasu siarkowego prowadziło do cyklizacji *S*-estrów metylu do odpowiednich 2-metylotio-1,3,4-tiadiazoli (Rysunek 6) [2]. Zbadałam również reaktywność otrzymanych *S*-estrów metylu wobec amin o różnej budowie. W wyniku ogrzewania z morfoliną lub *N*-aminomorfoliną w pirydynie związki cyklizowały do 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionów, a nie produktów podstawienia jak oczekiwałam. Jedynie substraty z układem *N*-tlenku pirydyny i *N*-tlenku pirazyny uległy jednocześnie podstawieniu i cyklizacji dając jako produkty 2-morfolino-1,3,4-oksadiazole [2,4]. Otrzymane 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tiony następnie poddałam metylowaniu jodkiem metylu w wodno – etanolowym roztworze wodorotlenku potasu do odpowiednich 2-metylosulfidów [2].



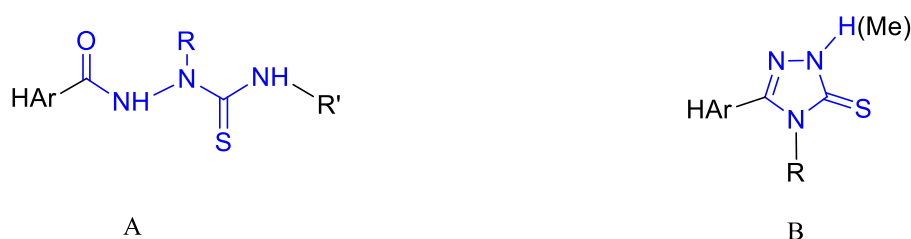
X = O, S
R = tiometyl, morfolina

Rysunek 6. Struktury otrzymanych pochodnych: 1,3,4-tiadiazoli, 1,3,4-oksadiazoli

S-estry metylowe poddawałam także działaniu *N*-aminopirerydyny w bezwodnej pirydynie przekształcając je w odpowiednie piperydynohydrazynokarbotoamid o strukturze tiosemikarbazydowej (Rysunek 7, struktura A). Reakcje przebiegające z wydzielaniem merkaptanu metylowego charakteryzowały się niską i umiarkowaną wydajnością (9-45%). Pozostałe pochodne tiosemikarbazydowe otrzymałam w bezpośredniej reakcji hydrazydów z odpowiednimi izotiocyjanianami: metylu, allilu, cykloheksylu i 4-chlorofenylu. Reakcje prowadziłam w obojętnych rozpuszczalnikach jak dioksan czy dimetyloformamid. Ogrzewanie pochodnych tiosemikarbazydowych w słabo zasadowym roztworze 10% węgla potasu lub w 10% roztworze wodorotlenku sodu prowadziło do cyklizacji i powstania odpowiednich 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów (Rysunek 7, struktura B) [1]. Syntezy te pozwoliły mi otrzymać nową klasę 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów posiadających podstawnik cykloalkiloaminowy w pozycji N-4, których metodę otrzymywania już wcześniej opublikowałam³¹.

³¹ K. Gobis, H. Foks, J. Francuz, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* 2006, 181, 977-986.

4-Cykloalkiloamino-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tiony otrzymałam także na drodze cyklizacji wyjściowych karbohydrazydów z *N*-amino-podstawionymi estrami metylowymi kwasów karbamoditiowych w obecności równomolowych ilości DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en) w bezwodnej pirydynie. Wbrew moim oczekiwaniom wydajność tych reakcji była niższa (42-45%) niż reakcji cyklizacji odpowiednich tiosemikarbazydów (69-75%). Cyklizację prowadziłam także w innego rodzaju środowisku zasadowym, mieszaninie wodnego roztworu węglanu potasu i dioksanu. Również w tym przypadku wydajność reakcji była umiarkowana. Brak środowiska zasadowego prowadził do struktur tiosemikarbazydowych [1].



R = H, Me
R' = alkil, cykloalkil, aryl, piperodyna

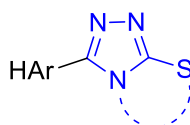
R = alkil, cykloalkil, aryl, hydroksyalkil, amina,
imina, cykloalkiloamina, alkilocykloalkiloamina

Rysunek 7. Struktury otrzymanych pochodnych: A – tiosemikarbazydów, B – 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów

Otrzymałam także 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tiony podstawione pierwszorzędową grupą aminową lub grupą metyloaminową w położeniu N-4. Reakcje te polegały na ogrzewaniu we wrzeniu odpowiednich *S*-estrów metylowych z hydrazyną lub metylohydrazyną. Dla pochodnej pirymidynowej przeprowadziłam reakcję bezpośrednią, w której na karbohydrazyd działałam disiarczkiem węgla i wodzianem hydrazyny w wodno – etanolowym roztworze TEA. Wydajność tej reakcji była nieco wyższa (53%) niż reakcji pomiędzy odpowiednimi *S*-estrami a hydrazynami (16-44%). 4-Amino-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tiony poddałam kondensacji z 4-chlorobenzaldehydem i 5-nitrotiofeno-2-karboksyaldehydem, a jeden z 4-metyloamino-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów reakcji z izotiocyanianem allilu otrzymując odpowiednio hydrazony i pochodną hydrazonokarbotoamidową [1].

Następnie zsyntetyzowałam szereg 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów podstawionych w położeniu N-4 grupami alkilohydroksylowymi lub alkilocykloalkiloaminowymi. W tym celu poddałam odpowiednie heteroaroiłohydrazonokarboditiany metylu reakcji z aminoalkoholami (2-aminoetanolem, 3-aminopropan-1-olem, 1-aminopropan-2-olem,

3-aminopropan-1,2-diolem) oraz 2-cykloalkilaminoalkiloaminami (2-(pirolidyn-1-ylo)-etanoamina, 2-morfolinoetanoamina, 2-(piperydyn-1-ylo)etanoamina) [2,4]. W przypadku pochodnej *N*-tlenku pirazyny tylko reakcja z 2-aminoetanołem przebiegła w spodziewanym kierunku. Pozostałe reakcje prowadzone w podobnych warunkach przebiegały z hydrolitycznym rozpadem wiązania amidowego, a produktem był 1-tlenek 3-karboksypirazyny. 4-Hydroksyalkilo-1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tiony cyklizowałam następnie w stężonym kwasie solnym do odpowiednich 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3]tiazyn (Rysunek 8) [2].



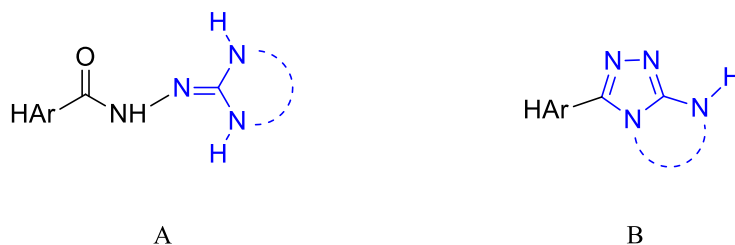
Rysunek 8. Struktura otrzymanych 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3]tiazyn

1,2,4-Triazolo-5(4*H*)-tiony posiadające w położeniu C-3 podstawnik 2-pirydylowy w reakcjach alkilowania przeprowadziłam w odpowiednie sulfidy przy pomocy jodku metylu, 1-(2-chloroetylo)pirolidyny oraz chlorowodoru 4-(2-chloroetylo)morfoliny w wodnym roztworze wodorotlenku sodu. Następnie nadmiarem 30% roztworu nadtlenku wodoru i kwasu octowego metylosulfidy ulegały utlenianiu do odpowiednich metylosulfotlenków [1].

Heteroaroiłokarbonohydrazonoditiany dimetylu w reakcji z aminami, jak dimetyloamina, morfolina i *N*-aminopiperydyna cyklizowały do 1,3,4-oksadiazoli z różnymi podstawnikami w położeniu C-2. W reakcji z morfoliną otrzymałam pochodną z podstawnikiem morfolinowym, natomiast z *N*-aminopiperydyną 2-metylotio pochodne [3,4]. Podobny kierunek reakcji obserwowałam ogrzewając substrat we wrzącej pirydyinie. W widmach IR tych produktów stwierdziłam zanik pasma w zakresie 1640-1680 cm⁻¹, odpowiadającego drganiom rozciągającym grupy karbonylowej. Zaobserwowałam również brak sygnałów dla protonów *N*-aminopiperydyny w widmach ¹H NMR. Obecny w nich był natomiast singlet 3H przy 2,80 ppm, odpowiadający grupie tiometylowej.

Ditiany dimetylu poddałam także reakcjom z diaminami: 1,2-diaminoetanem, 1,3-diaminopropanem, 1,3-diamino-2,2-dimetylopropanem i 1,3-diaminopropan-2-olem. Zauważyłam, że struktura produktów w tym przypadku zależała od rodzaju substratów i rozpuszczalnika. Krótkie (1 godz.) ogrzewanie w temperaturze wrzenia wobec

dwukrotnego nadmiaru diaminy w etanolu lub dioksanie prowadziło do pochodnych 1,3-diazacykloalkilo-2-ylidenowych (Rysunek 9, struktura A). Zastosowanie w przypadku pochodnej 6-metoksypirazynowej 1,3-diamino-2,2-dimetylopropanu w diglimie (eterze di(2-metoksyetylowym)) spowodowało cyklizację substratu do 2-metylotio-1,3,4-oksadiazolu. Dłuższe (6 godz.) ogrzewanie substratów we wrzeniu z dwukrotnym nadmiarem diaminy w środowisku wodnym w pierwszym etapie prowadziło również do pochodnych 1,3-diazacykloalkilo-2-ylidenowych, które następnie cyklizowały do struktur bicyklicznych 5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pirymidyn (Rysunek 9, struktura B) [3,4]. Taki przebieg reakcji obserwowałam dla prawie wszystkich diamin.



Rysunek 9. Struktura otrzymanych związków: A – pochodnych 1,3-diazacykloalkilo-2-ylidenowych, B - 5,6,7-tetrahydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pirymidyn

Otrzymane substancje przebadano pod kątem aktywności przeciwgruźliczej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Wszystkie badania w kierunku aktywności tuberkulostatycznej dla związków objętych tym opracowaniem wykonał ten sam Zespół badawczy. Oceniana była aktywność tuberkulostatyczna pochodnych wobec szczepu standardowego H₃₇Rv *M. tuberculosis* i dwóch szczepów „dzikich” izolowanych od pacjentów chorych na gruźlicę, szczepu Spec. 210, opornego na kwas *p*-aminosalicylowy (PAS), izoniazyd (INH), etambutol (ETB) i rifampicynę (RMP) oraz szczepu Spec. 192, w pełni wrażliwego na stosowane leki. Wyznaczone minimalne stężenia hamujące wzrost szczepów (MIC) dla większości przebadanych związków mieściły się w zakresie 50-100 µg/ml, co wskazuje na słabą aktywność tuberkulostatyczną. Wyższą aktywność w badanej grupie miały pojedyncze związki. Znalazły się wśród nich pochodne *N*-tlenku pirydyny i *N*-tlenku pirazyny. Przykładem może być 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tion z pierścieniem *N*-tlenku pirydyny w położeniu C-5 czy 1,3,4-oksadiazole podstawione przy C-5 układem *N*-tlenku pirydyny lub *N*-tlenku pirazyny, a przy C-2 morfoliną [2,3]. Wyznaczone dla tych związków wartości MIC mieściły się w granicach 12,5-25 µg/ml wobec szczepu

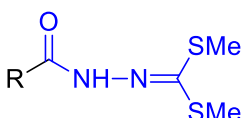
wrażliwego (Spec. 192), 12,5-50 µg/ml wobec szczepu standardowego (H₃₇Rv) i 25-50 µg/ml wobec szczepu opornego (Spec. 210). Podobne wartości MIC zostały uzyskane dla *S*-estru metylowego i *S,S'*-diestru dimetylowego, będących pochodnymi *N*-tlenku pirazyny lub *N*-tlenku pirydyny [1,3], a także 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów z podstawnikami hydroksyalkilowymi w położeniu N-4 [2]. Niektóre związki, jak 1-tlenek 3-(2-(tetrahydropirymidyn-2(1*H*)-ylideno)hydrazonokarbonylo)pirazyny, będący pochodną heksahydropirymidyny, wykazały wyższą aktywność wobec szczepu opornego niż wobec wrażliwego [3]. Zjawisko to jest najprawdopodobniej spowodowane zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi, jakie występują w komórkach opornych i są związane z ekspresją tej cechy drobnoustrojów. Jeżeli substancja czynna oddziałuje w komórce prętka z celem molekularnym, który ulega nadekspresji w komórce odpornej, to jej powinowactwo do takiej komórki będzie większe niż do komórki wrażliwej, co wydaje się niezwykle korzystne dla powodzenia terapii, zwłaszcza wobec narastającego problemu oporności.

Pochodne 6-metoksypirazynowe przebadane zostały także w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej wobec 25 szczepów bakterii beztlenowych i 25 szczepów bakterii tlenowych izolowanych z jamy ustnej, układu oddechowego i jamy brzusznej oraz 12 szczepów standardowych³². Interesujący jest fakt, że badane związki wykazały wyższą aktywność wobec bakterii beztlenowych niż bakterii tlenowych. Wszystkie pochodne aktywne wobec anaerobów były bardziej aktywne wobec szczepów bakterii Gram+. Bakterie tlenowe wykazały wrażliwość na imidazolin-2-ylidenocarbohydrazyd kwasu 6-metoksypirazynokarboksyłowego w stężeniu 6,2-25 µg/ml (20% szczepów). W tym samym zakresie stężeń aktywne były także 1,3,4-triazolo-5(4*H*)-tion z podstawnikiem etylenohydroksyłowym przy N-4 oraz 2-morfolino-1,3,4-oksadiazol (16% szczepów). Pochodna imidazolin-2-ylidenohydrazydowa wykazała także aktywność wobec szczepów bakterii tlenowych w stężeniu 25 µg/ml (4% szczepów). Wszystkie spośród przebadanych związków wykazały bardzo słabą aktywność wobec szczepów standardowych (MIC >200 µg/ml) [4].

Otrzymane wyniki aktywności dla *S*-estru metylowego i *S,S'*-diestru dimetylowego, pochodnych *N*-tlenku pirazyny i *N*-tlenku pirydyny, które wyróżniły je w przebadanej grupie związków [1,3], skłoniły mnie do podjęcia syntezy benzoilokarbonohydrazonoditianów dimetylu z różnymi podstawnikami przy

³² Badania aktywności przeciwbakteryjnej przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Jamy Ustnej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny).

pierścieniu benzenowym (Rysunek 10). Wśród otrzymanych *S,S'*-diestrów dimetylowych znalazły się pochodne zawierające atomy chloru lub grupę nitrową w położeniu 2 lub 4, dwa atomy chloru w położeniach 2,4 lub 3,4, grupę hydroksylową w położeniu 2, 3 lub 4, grupę metoksyłową w położeniu 4, trzy grupy metoksyłowe w położeniach 3,4,5. Otrzymałam także pochodną fenylooctową z podstawnikami metoksyłowymi w położeniach 3,4,5 pierścienia benzenowego oraz pochodną pirazyny [5].



R = aryl, alkiloaryl, pirazyna

Rysunek 10. Struktura otrzymanych benzoilokarbonohydrazonoditaniaów dimetylu

Wyjściowe karbohydrazydy poddałam w temperaturze pokojowej reakcji z CS₂ i dwukrotnym nadmiarem jodku metylu w środowisku wodorotlenku potasu lub TEA, stosując dwukrotny nadmiar molowy zasady. W widmach ¹H NMR, wykonanych dla otrzymanych związków, zaobserwowałam nierównocенność magnetyczną grup tiometylowych, spowodowaną zapewne zahamowaniem rotacji wokół wiązania podwójnego i oddziaływaniem tych grup z innymi elementami cząsteczki, np. atomem chloru lub grupą nitrową w położeniu 2. Dla niektórych pochodnych, np. 2,4-dichlorobenzoilokarbonohydrazonoditaniau dimetylu, grupy te dawały sygnały w postaci dwóch lekko rozsuniętych singletów przy ok. 2,50 ppm. Podobnie było w przypadku widm ¹³C NMR, sygnały odpowiadające węglom grup tiometylowych były rozsunięte o ok. 0,40 ppm świadcząc o nierównocенności magnetycznej tych atomów [5].

Opisane oddziaływanie zostało dobrze zilustrowane w strukturze monokryształu pochodnych 2-nitro i 4-nitro³³. Zmierzone długości wiązań C-N i N-N wskazują na podwójny charakter tych wiązań i tłumaczą zahamowanie rotacji, a co za tym idzie, różny rozkład gęstości elektronowej wokół obu grup tiometylowych. Brak podstawników przy pierścieniu lub wprowadzenie podstawników wywierających słabszy ujemny efekt indukcyjny (OH, OCH₃) nie powoduje tego efektu, a protony grup

³³ Badania krystalograficzne wykonane zostały w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej.

tiometylowych takich pochodnych występują w widmie ^1H NMR w postaci wspólnego singletu o integracji 6H [5].

Otrzymane pochodne zostały przebadane w kierunku aktywności tuberkulostatycznej. Najwyższą aktywność przeciwgruźliczą wykazała pochodna posiadająca grupę nitrową w położeniu 4 pierścienia benzenowego z MIC 3,1 $\mu\text{g/ml}$ wobec szczepu H₃₇Rv i Spec. 192. Jej aktywność wobec szczepu opornego Spec. 210 była niższa (25 $\mu\text{g/ml}$). Pochodna posiadająca dwa atomy chloru w pozycjach 2,4 wykazała najwyższą aktywność wobec szczepu opornego z wartością MIC 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Związek ten był również bardzo aktywny wobec szczepów H₃₇Rv i Spec. 192 (MIC 6,2 i 3,1 $\mu\text{g/ml}$). Podobną aktywność wykazał związek z grupą hydroksylową w położeniu 4. Hamował on wzrost szczepów w stężeniach 3,1 $\mu\text{g/ml}$ (H₃₇Rv), 6,2 $\mu\text{g/ml}$ (Spec. 192) i 25 $\mu\text{g/ml}$ (Spec. 210). Pozostałe pochodne wykazały umiarkowaną aktywność z wartościami MIC w zakresie 6,2-25 $\mu\text{g/ml}$ [5]. Pochodne posiadające podstawniki metoksykowe oraz pochodna z niepodstawionym pierścieniem benzenowym wykazały aktywność na poziomie MIC w zakresie 25-50 $\mu\text{g/ml}$ wobec wszystkich badanych szczepów *M. tuberculosis*. Wszystkie związki wykazały aktywność niższą niż INH i RMP (0,5-1,1 $\mu\text{g/ml}$ i 1,2-2,5 $\mu\text{g/ml}$), ale porównywalną z właściwą dla ETA (2-5 $\mu\text{g/ml}$) i wyższą niż uzyskana dla PZA (25-400 $\mu\text{g/ml}$), stosowanego powszechnie jako chemoterapeutyk drugiego rzutu.

Na podstawie powyższych wyników wywnioskowałam, że podstawniki elektroujemne, jak grupa nitrowa, atom chloru, grupa hydroksylowa, w pozycji 4 sprzyjają zwiększeniu aktywności tuberkulostatycznej, podczas gdy pochodne z podstawnikami w położeniu 2 wykazują aktywność umiarkowaną i niską. Znamienny jest fakt, że pochodna posiadająca grupę nitrową w położeniu 2 posiada warunki strukturalne umożliwiające tworzenie dodatkowego wiązania wodorowego i powiększenie planarnego fragmentu cząsteczki, co powinno sprzyjać zwiększeniu aktywności przeciwgruźliczej³⁴. Tymczasem związek ten wykazał relatywnie słabą aktywność tuberkulostatyczną. Natomiast pochodna z grupą nitrową w położeniu 4, która nie ma możliwości zwiększenia swojej planarności, wykazała aktywność najwyższą. Otrzymane wyniki mniej zaskakują, kiedy spojrzysz na strukturę pochodnych z punktu widzenia bioizosterii. Fragment nitrofenylowy jest nieklasycznym

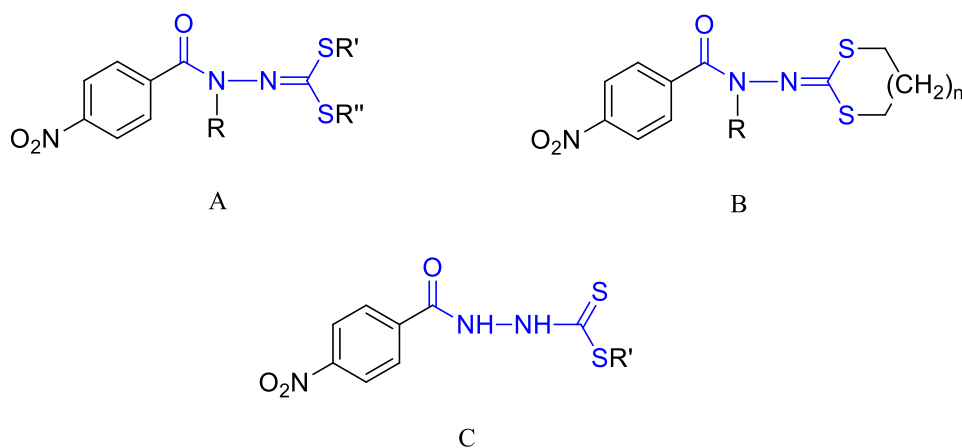
³⁴ M. L. Główska, D. Martynowski, A. Olczak, C. Orlewska, H. Foks, J. Bojarska, M. Szczesio, J. Gołka, *J. Chem. Cryst.* 2005, 35, 477-480.

bioizosterem ugrupowania pirydylowego³⁵, więc można spodziewać się podobnego działania biologicznego pochodnej 4-nitro i izoniazydu, jako konsekwencji analogii strukturalnej obu związków.

Poszerzone badania aktywności tuberkulostatycznej wobec innych szczepów *M. tuberculosis*, np. An5, Wells, Kirchberg, Kansasii, wykazały, że związki są aktywne jedynie wobec niektórych szczepów. Pochodne 3,4-dichloro, 4-nitro i 4-hydroksy wykazały najwyższą aktywność (MIC 6,2-25 µg/ml).

Trzy najbardziej aktywne związki z tej grupy zostały przebadane pod kątem aktywności cytotoksycznej wobec linii komórkowych nowotworów ludzkich: ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i ludzkiego raka okrężnicy HCT116³⁶. Uzyskane dla badanych pochodnych wartości IC₅₀ (zahamowanie wzrostu komórek w 50%) były od 3 do 10 razy wyższe niż wartości MIC dla odpowiednich pochodnych i wyniosły 30-100 µM. Należy zatem wnioskować, że aktywność tuberkulostatyczna tych związków nie jest związana z aktywnością cytotoksyczną [5].

W związku z wysoką aktywnością tuberkulostatyczną 4-nitrobenzoilokarbonohydrazonoditanu dimetylu podjęłam decyzję o poszerzeniu grupy jego pochodnych o związki modyfikowane w układzie hydrazydowym i w grupie ditianowej (Rysunek 11) [6].



R = H, Me
R', R'' = Me, *i*-Pr, *n*-Bu, *n*-C₁₀H₂₁, Bzl

Rysunek 11. Struktury otrzymanych pochodnych kwasu 2-(4-nitrobenzoilo)hydrazyno-karboditiowego: A, B – S,S'-diestrów, C – S-estrów

³⁵ N. Bodor, *Ann. NY Acad. Sci.* 1987, 507, 289-306.

³⁶ Badania aktywności cytotoksycznej przeprowadzono w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

Modyfikacje w układzie hydrazydowym miały na celu uniemożliwienie ewentualnego tworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy protonami tego układu a elektroujemnym podstawnikiem pierścienia benzenowego. Modyfikując grupę ditianową chciałam sprawdzić, jaki wpływ na aktywność związków będzie miało wydłużenie podstawników alkilowych, ewentualnie zamknięcie tego fragmentu w układ cykliczny.

Wyjściowy 4-nitrobenzhydrazyd oraz *N*-metylo-4-nitrobenzhydrazyd przeprowadziłam w odpowiednie *S,S'*-diestry symetryczne działaniem CS₂ i dwukrotnego nadmiaru odpowiedniego haloidku (jodku metylu, jodku izopropylu, jodku *n*-butylu, chlorku benzylu i jodku *n*-decylu) lub równomolowej ilości dihalidku (1,2-dibromoetanu, 1,3-dibromopropanu) w metanolowym roztworze TEA. Stosowałam dwukrotny nadmiar TEA w stosunku do wyjściowego hydrazidu. Reakcje przebiegały korzystnie w temperaturze pokojowej i pożądane produkty uzyskiwałam z dobrą wydajnością (50-96%). Oddziaływanie 4-nitrobenzohydrazidu z jodkiem izopropylu nie prowadziło do powstania planowanego *S,S'*-diestru. Świadczył o tym brak pasm odpowiadających drganiom rozciągającym wiązania C=O i N-H w widmie IR. Ponadto w widmie ¹H NMR stwierdziłam brak protonu grupy NH, a integracja wykazała o połowę mniejszą liczbę protonów alkilowych. Analiza elementarna i spektrometria mas dostarczyły dowodów na stwierdzenie, że otrzymanym związkiem był 2-(izopropylotio)-5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazol [6].

Z 4-nitrobenzhydrazidu otrzymałam także *S*-estry. Reakcje przeprowadziłam w temperaturze pokojowej w metanolowym roztworze TEA stosując odpowiednie jodki alkilu. Otrzymałam *S*-ester metylu, izopropylu i *n*-butylu. Reakcji z jodkiem izopropylu częściowo towarzyszyła cyklizacja powstałego produktu addycji CS₂ do hydrazidu i obok pożądanego *S*-estru otrzymałam także 5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tion. Nasunęło to konkluzję na temat konkurencyjności reakcji podstawienia i cyklizacji. W przypadku drugorzędowej halogenopochodnej reakcja podstawienia przy atomie siarki zachodzi na tyle wolno, że produkt pośredni reakcji szybciej ulega cyklizacji. Cyklizacja *S*-estru izopropylowego z kolei zachodzi znacznie szybciej niż podstawienie przy drugim atomie siarki i powstawanie *S,S'*-diestru diizopropylu [6]. Dla odmiany pochodną *S*-butylową 5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu otrzymałam z łatwością w reakcji 4-nitrobenhydrazidu z CS₂ i TEA w metanolu. Produkt cyklizacji alkilowałam jodkiem *n*-butylu bez uprzedniej izolacji. Karboditian

metylu poddałam dalszemu alkilowaniu w metanolowym roztworze TEA. Otrzymałam w ten sposób *S,S'*-diestry mieszane z różnymi podstawnikami przy atomach siarki.

Zsyntetyzowane *S*-estry i *S,S'*-diestry zostały przebadane pod kątem aktywności tuberkulostatycznej [6]. Wszystkie związki wykazały umiarkowaną aktywność. Pośród ditianów symetrycznych najwyższą aktywność wykazała pochodna *S,S'*-dimetylowa MIC (12,5-50 µg/ml). Pozostałe *S,S'*-diestry symetryczne wykazały słabą aktywność tuberkulostatyczną (MIC 50-100 µg/ml). W grupie *S,S'*-diestrów mieszanych najwyższą aktywność wykazała pochodna izopropylu-metylowa z wartościami MIC w zakresie 25-50 µg/ml. Z powyższego wynika, że istotny dla aktywności przeciwgruźliczej jest rozmiar podstawników przy atomach siarki, przynajmniej jeden z nich powinien być relatywnie mały. Najwyższą aktywność w całej testowanej grupie wykazały 2-izopropylotio- i 2-butyliotio-5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazol. Wartości MIC wyniosły 6,2-12,5 µg/ml wobec szczepu H₃₇Rv i szczepu wrażliwego Spec. 192 oraz 25 µg/ml wobec szczepu opornego Spec. 210. Wyniki te wskazują na szerokie spektrum przeciwdrobnoustrojowe 5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazoli, których aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza została już opisana³⁷. Dla 2-butyliotio-5-(4-nitrofenylo)-1,3,4-oksadiazolu wykonana została krystalografia rentgenowska. Otrzymane wyniki wykazały obecność słabych oddziaływań między protonem grupy metylenowej przy atomie siarki a atomem azotu N-4 [6], które zdają się nie mieć większego wpływu na przyjmowaną konformację i aktywność związku.

W II etapie badań podjęłam syntezę związków będących pochodnymi analogów strukturalnych heterocyklicznych karbohydrazydów i amidów, tj. amidoksymów i amidyn [7,8]. Taki kierunek poszukiwań podyktowany był faktem, że grupa amidoksymowa jest klasycznym bioizosterem ugrupowania amidrazonowego i hydrazydowego³⁸. Ponadto stwierdzono, że amidoksymy są dla amidyn prolekami^{39,40} i produktami pośrednimi do syntezy związków heterocyklicznych, np. oksadiazoli⁴¹.

Substratami dla przeprowadzonych reakcji były heterocykliczne karbonitryle, pochodne pirydyny, pirazyny, pirymidyny, chinoliny oraz *N*-tlenku pirydyny i *N*-tlenku pirazyny. Amidoksymy syntetyzowałam z odpowiednich karbonitryli działaniem hydroksyloaminy (*Rysunek 12*). *O*-Metylowanie pirazynokarboksyamidoksymu do *O*-

³⁷ A. N. Majekar, H. S. Yathirajan, B. Narayana, B. K. Sarajini, N. S. Kumari, *Int. J. Chem.* 2010, 2, 38-54.

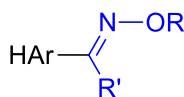
³⁸ F. Pop, W.-M. Wu, N. Bodor, *J. Med. Chem.* 1989, 32, 1789-1795.

³⁹ T. Weller, L. Alig, M. Beresini, B. Blackburn, S. Bunting, P. Hadváry, M. H. Müller, D. Knopp, B. Levet-Trafit, M. T. Lipari, N. B. Modi, M. Müller, C. J. Refino, M. Schmitt, P. Schönholzer, S. Weiss, B. Steiner, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 3139-3147.

⁴⁰ B. Clement, *Drug Metab. Rev.* 2002, 34, 565-579.

⁴¹ A. Hamzé, J. F. Hernandez, P. Fulcrand, J. Martinez, *J. Org. Chem.* 2003, 68, 7316-7320.

metylopirazynokarboksyamidoksymu przeprowadziłam przy użyciu jodku metylu w alkalicznym środowisku wodno – metanolowego roztworu wodorotlenku potasu [7]. Metylowanie pirydynowego atomu azotu 3- i 4-pirydynokarboksyamidoksymu przeprowadziłam jodkiem metylu w bezwodnym dioksanie otrzymując odpowiednie jodki 1-metylopirydyniowe [8]. Chlorek *N*-metoksypirazynoimidoilu oraz chlorki *N*-hydroksyheteroaryloimidoilu otrzymałam z amidoksymów działając azotanem(III) sodu w roztworze kwasu solnego w temperaturze 0°C. Chlorki dawały się izolować ze środowiska reakcji z różną wydajnością (53-97%). Na otrzymane chlorki imidoilu działałam następnie aminami drugorzędowymi w bezwodnym metanolu lub dioksanie. W ten sposób zsyntetyzowałam odpowiednie oksymy [7,8]. Do reakcji użyłam heksaetylenoiminę, morfolinę, 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan, 1-(pirydyn-2-ylo)piperazynę, 1-metylopiperazynę, 1-fenylpiperazynę, 1-benzylopiperazynę, 1-piperonylo-piperazynę, 1-(4-fluorofenyl)piperazynę, 1-(2-metoksyfenyl)piperazynę, 1-(4-nitrofenyl)piperazynę, 1-(3,4-dichlorofenyl)piperazynę, 1-(difenylometyl)piperazynę, *trans*-1-cynamylopiperazynę. W przypadku *O*-metylooksymów jedynie 1-fenylpiperazyna reagowała z chlorkiem *N*-metoksypirazynoimidoilu z dobrą wydajnością (64%), która właściwa była dla reakcji chlorków *N*-hydroksyheteroaryloimidoilu. Reakcję chlorku *N*-metoksypirazynoimidoilu z 1-benzylopiperazyną przeprowadziłam z dobrą wydajnością 84% mieszając substraty w stosunku molowym 1:20 bez rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej [7].

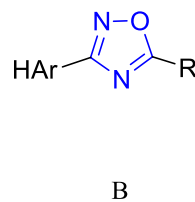
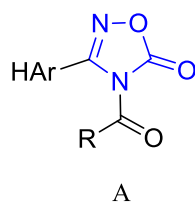


R = H, Me
R' = NH₂, Cl, cykloalkiloamina

Rysunek 12. Struktura otrzymanych amidoksymów i ich pochodnych

Amidoksymy poddałam także reakcjom z chlorkami karbamoilowymi [8]. Stosowałam chlorek dimetylokarbamoilu, chlorek dietylokarbamoilu, chlorek diizopropylkarbamoilu oraz chlorek morfolino-4-karbonylu. Reakcje prowadziłam stosując trzykrotny nadmiar chlorku w bezwodnej pirydynie. Jako produkty uzyskałam oczekiwane 3,4-dipodstawione 1,2,4-oksadiazoli-5(4*H*)-ony (Rysunek 13, struktura A), będące efektem wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowej pary elektronowej

atomu azotu grupy aminowej na węgiel karbonylowy fragmentu karbamoilowego związanego z atomem tlenu grupy hydroksylowej amidoksyemu w miejsce protonu. Atak ten jest poprzedzony podstawieniem protonu grupy hydroksylowej i jednego z protonów grupy aminowej ugrupowaniami karbamoilowymi. W przypadku chlorku dimetylokarbamoilu reakcja przebiegała w kierunku 3-monopodstawionych 1,2,4-oksadiazolo-5(4*H*)-onów. Produkty te powstawały najprawdopodobniej w wyniku szybkiego ataku pary elektronowej atomu azotu grupy aminowej na węgiel karbonylowy zanim proton grupy NH₂ uległ podstawieniu przez karbamoil. Podobny wynik uzyskałam dla kontrolnych reakcji pomiędzy amidoksyemami a chloromrówczanem etylu. Otrzymane 1,2,4-oksadiazolo-5(4*H*)-ony poddałam następnie reakcji podstawienia otrzymując zaplanowane 3,4-dipodstawione pochodne. Dwa amidy poddałam w temperaturze 215°C termicznej dekarboksylacji do 5-alkiloamino-1,2,4-oksadiazoli (*Rysunek 13*, struktura B) [8].



R = Me, Et, *i*-Pr, morfolina

*Rysunek 13. Struktury otrzymanych pochodnych:
A - 1,2,4-oksadiazolo-5(4H)-onów, B - 1,2,4-oksadiazoli*

Otrzymane związki zostały przebadane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej⁴². Spośród 45 pochodnych 35 (78%) wykazało zróżnicowaną aktywność wobec testowanych szczepów bakterii beztlenowych. Beztlenowce były najbardziej wrażliwe przy stężeniach w zakresie $\leq 6,2$ -100 $\mu\text{g/ml}$ wobec chlorku *N*-hydroksypirazynokarboksyimidoilu (44% szczepów) [7] i chlorku *N*-hydroksy-2-pirydynokarboksyimidoilu (40% szczepów) oraz dwóch oksymów, pochodnych *N*-tlenku pirydyny (25% szczepów) [8]. Większość związków aktywnych wobec bakterii beztlenowych była bardziej aktywna wobec szczepów bakterii G⁺. Chlorek *N*-hydroksy-4-pirydynokarboksyimidoilu, 3-(pirazyn-2-yl)-1,2,4-oksadiazolo-5(4*H*)-on, oksym będący pochodną *N*-tlenku pirydyny i 1-benzylpiperazyny (89% szczepów) oraz oksym, pochodna pirazyny i 1-(4-fluorofenylo)piperazyny (66% szczepów)

⁴² Badania aktywności przeciwbakteryjnej przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Jamy Ustnej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny).

aktywne były wobec największej liczby szczepów. Z kolei pirazynokarboksyamidoksym, *O*-metylopirazynokarboksyamidoksym, 3-(pirydyn-3-ylo)-1,2,4-okso-diazolo-5(4*H*)-on oraz oksym, pochodna *N*-tlenku pirydyny i 1-piperonylopiiperazyny były bardziej aktywne wobec beztlenowych pałeczek *G*- [7,8].

Tylko 4 związki (9%) wykazały aktywność wobec bakterii tlenowych. Były to pirazynokarboksyamidoksym (6,2-50 µg/ml, 32% szczepów), *O*-metylopirazynokarboksyamidoksym (50 µg/ml, 24% szczepów), chlorek *N*-hydroksypirazynokarboksyimidoilu (25-100 µg/ml, 33% szczepów) oraz oksym będący pochodną pirydyny i 1-piperonylopiiperazyny (50-100 µg/ml, 16% szczepów). Związki te były aktywne wobec obu typów bakterii, tlenowych i beztlenowych [7,8].

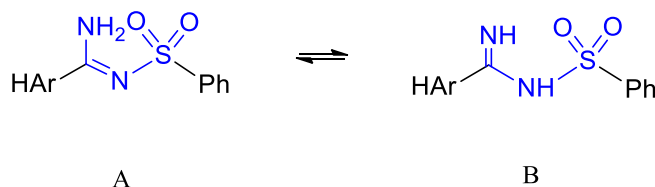
Szczepy standardowe generalnie wykazywały oporność wobec testowanych związków (MIC ≥ 200 µg/ml). W przypadku bakterii beztlenowych 6 związków wykazało aktywność wobec *Fusobacterium nucleatum* (ATTC 25586). W grupie tej znalazł się chlorek *N*-hydroksypirazynokarboksyimidoilu (MIC 25 µg/ml), pirazynokarboksyamidoksym (100 µg/ml) oraz niektóre oksymy (50-100 µg/ml) [7,8]. Pirazynokarboksyamidoksym wykazał także aktywność wobec standardowego szczepu *Peptostreptococcus anaerobius* (ATTC 27337) (MIC 50 µg/ml). Oksym, pochodna pirydyny i 1-piperonylopiiperazyny, był aktywny wobec szczepu *Bacillus vulgaris* (ATTC 8482) (MIC 100 µg/ml). Ten sam związek w podobnym stężeniu hamował wzrost dwóch szczepów tlenowych, *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 13883) i *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923). Wzrost szczepów *K. pneumoniae* hamowały także: pirazynokarboksyamidoksym, *O*-metylopirazyno-karboksyamidoksym oraz chlorek *N*-hydroksypirazynokarboksyimidoilu (MIC 50 µg/ml).

Otrzymane związki przetestowano także pod kątem aktywności przeciwgruźliczej wobec szczepów *M. tuberculosis* [7,8]. Wyznaczone wartości MIC dla badanych pochodnych mieściły się w przedziale 25-100 µg/ml, co wskazuje na umiarkowaną i niską aktywność przeciwgruźliczą. Jedynie chlorek *N*-hydroksy-2-pirydynokarboksyimidoilu wykazał wyższą aktywność. Hamował on wzrost szczepu H₃₇Rv w stężeniu 12,5 µg/ml, zaś szczepy izolowane od pacjentów, Spec. 192 i Spec. 210, w stężeniu 25 µg/ml [8].

Podsumowując w grupie tej najwyższą aktywność wykazały pochodne pirazyny, zwłaszcza amidoksym i chlorek karboksyimidoilu. Związki te charakteryzowały się szerokim spektrum działania. Na uwagę zasługuje fakt, że jako nieliczne wykazały aktywność wobec standardowych szczepów bakterii.

Kontynuując kierunek badawczy wykorzystujący heterocykliczne karbonitryle podjęłam syntezę związków będących pochodnymi heterocyklicznych sulfonamidyn. Sulfonamidy nadal cieszą się zainteresowaniem różnych zespołów badawczych z powodu swojej aktywności przeciwdrobnoustrojowej^{43,44}. Związki z tej grupy wykazują także działanie przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe⁴⁵ i przeciwnowotworowe⁴⁶. Wśród amidyn również znaleziono związki o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwwirusowej^{47,48}. Było zatem interesujące, jak połączenie tych dwóch ugrupowań w jedno wpłynie na aktywność przeciwbakteryjną otrzymanych związków. Zwłaszcza, że grupa amidynowa może z powodzeniem pełnić funkcję fragmentu łączącego dwa farmakofory, np. ugrupowanie sulfanilamidowe i układ pirydyny czy pirazyny.

Podjęłam zatem syntezę heterocyklicznych sulfonylokarboksylimidoamidów (Rysunek 14). Zastosowana metoda, polegała na użyciu substratów w postaci heteroaryloiminoestrów pirydyny, pirymidyny, pirazyny, 6-chloro- i 6-metoksy-pirazyny oraz chinoliny [9-12]. Największą jej zaletą było wykorzystanie heteroaryloiminoestrów w chwili ich powstania, bez uprzedniej izolacji. Iminoestry to związki o dużej reaktywności. Reagują między innymi z aminami dając jako produkty amidyny. Opisane są również nieliczne reakcje alkilo- i fenyloiminoestrów z sulfonamidami, w wyniku których powstają sulfonamidyny⁴⁹.



Rysunek 14. Struktury odmian tautomerycznych otrzymanych sulfonylokarboksylimidoamidów

Iminoestry otrzymałam z odpowiednich karbonitryli w obecności DBU w metanolu i bez izolacji poddałam dalszej reakcji z benzenosulfonamidem lub 4-aminobenzenosulfonamidem. W przypadku syntezy pochodnych pirazyny i 6-metoksy-pirazyny izolowałam powstałe iminoestry, które łatwo otrzymałam w czystej postaci.

⁴³ V. Klimešová, L. Zahajská, K. Waisser, J. Kaustová, U. Möllmann, *Farmaco* 2004, 59, 279-288.

⁴⁴ X.-L. Wang, K. Wan, C.-H. Zhou, *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 4631-4639.

⁴⁵ S. Isik, F. Kockar, M. Aydın, O. Arslan, O. O. Guler, A. Innocenti, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 1158-1163.

⁴⁶ N. S. El-Sayed, E. R. El-Bendary, S. M. El-Ashy, M. M. El-Kerdawy, *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 3714-3720.

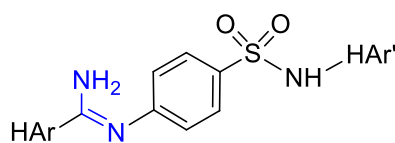
⁴⁷ A. Echevarria, L. H. Santos, J. Miller, N. Mahmood, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 1901-1904.

⁴⁸ P. M. S. Bedi, M. P. Mahajan, V. K. Kapoor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3821-3824.

⁴⁹ T. Fujisawa, C. Mizuno, *Yakugaku Zasshi* 1952, 72, 694-695.

Syntezyowałam je odpowiednio z 2-cyjanopirazyny i 6-chloro-2-cyjanopirazyny w reakcji z metanolanem sodu w metanolu⁵⁰[9] lub w roztworze metanolem DBU [10-12]. Ta ostatnia metoda okazała się bardziej dogodnym i wydajnym sposobem otrzymywania [10]. Iminoestry ogrzewałam z benzenosulfonamidem i 4-amino-benzosulfonamidem w diglimie. Reakcje przebiegały z umiarkowaną (38%) i bardzo dobrą (83%) wydajnością.

Przeprowadziłam także kondensację iminoestrów z sulfonamidami stosowanymi klinicznie, sulfamerazyną, sulfametazyną, sulfametoksypirydazyną oraz sulfatiazolem uzyskując odpowiednie produkty amidynowe (Rysunek 15).



HAr' = 4-metylopirymidyna, 4,6-dimetylopirymidyna,
4-metoksypirydazyna, tiazol

Rysunek 15. Struktura otrzymanych kondensatów iminoestrów z klinicznie stosowanymi sulfonamidami

W widmach ¹H NMR otrzymanych związków zaobserwowałam rozsunięte sygnały dla grup NH. Obraz taki mógł odpowiadać amino-iminowej strukturze tautomerycznej przyjętej przez otrzymane związki (Rysunek 14, struktura B)⁵¹, co zasugerowałam dla pochodnych 3-pirydylowych i 4-pirydylowych [9]. Mogło to również być następstwem nierównocенności magnetycznej protonów grupy NH₂ na skutek tworzenia wiązań wodorowych w przypadku związków heterocyklicznych, w których grupa amidynowa znajduje się w położeniu α do atomu azotu pierścienia heterocyklicznego. W celu rozwiązania tej kwestii wykonana została analiza krystalograficzna⁵² dla opisanego w literaturze N'-(4-aminofenylosulfonylo)-4-chloropikolinoimidoamidu⁵³[9]. Wyniki dyfrakcji na monokryształach potwierdziły aminową strukturę tautomeryczną. W stanie krystalicznym oba atomy wodoru związane są z jednym atomem azotu i mogą tworzyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, jeden z atomem azotu pierścienia aromatycznego, a drugi z atomem tlenu grupy

⁵⁰ H. Foks, M. Janowienc, *Acta Polon. Pharm.* 1979, 36, 155-160.

⁵¹ E. H. Northey, A. E. Pierce, D. J. Kartesz, *J. Am. Chem. Soc.* 1942, 64, 2763-2765.

⁵² Badania krystalograficzne wykonane zostały w Katedrze Chemii Fizycznej Uniwersytetu Gdańskiego.

⁵³ A. Bogdanowicz, H. Foks, A. Kędzia, E. Kwapisz, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć, *Heterocycles* 2009, 78, 2217-2231.

sulfonowej. Jest to powodem zmniejszenia symetrii i w konsekwencji powoduje ich nierównocенność magnetyczną w roztworze.

Rozwiązałam także kwestię struktury molekularnej produktów reakcji pomiędzy iminoestrami a 4-aminobenzenosulfonamidem, ponieważ grupą aktywną w tych reakcjach mogła być zarówno grupa aminowa fragmentu sulfonamidowego, jak również aromatyczna grupa aminowa [9,10]. Opisano bowiem reakcje amin aromatycznych i alifatycznych z iminoestrami⁵⁴. Przeprowadziłam więc reakcję pirazyno-2-iminoestru metylu z *N*-(4-sulfamoilofenylo)acetamidem [9]. Produkt końcowy był identyczny ze związkiem otrzymanym w wyniku działania bezwodnikiem octowym na pochodną powstałą w reakcji pirazyno-2-iminoestru metylu z 4-aminobenzenosulfonamidem. A zatem w sposób jednoznaczny wykazałam, że grupa sulfonamidowa jest grupą aktywną w przeprowadzonych reakcjach. Kolejną próbą była reakcja pomiędzy pirymidyno-2-iminoestrem metylu a pochodną sulfatiazolu pozbawioną aromatycznej grupy aminowej [10]. Próba ta wypadła negatywnie. Tak więc w przypadku kondensacji klinicznie stosowanych sulfonamidów z iminoestrami aktywna była pierwszorzędowa grupa 4-feniloaminowa.

Otrzymane pochodne zostały przebadane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów standardowych *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Echerichia coli* (ATCC 25922) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)⁵⁵. Do badań włączone zostały także dwa szczepy grzybów z rodzaju *Candida*, *C. albicans* (ATCC 90028) i *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Wyniki wykazały niską aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną testowanych związków. Dla większości z nich wartości MIC wyniosły >256 µg/ml [9,10]. Wszystkie związki poza stosowanym klinicznie sulfatiazolem wykazały bardzo słabą aktywność wobec *P. aeruginosa*, także pozostałe sulfonamidy kliniczne. Uzyskane wartości MIC wyniosły 128 µg/ml dla sulfatiazolu i >256 µg/ml dla pozostałych związków [9,10]. Wszystkie kondensaty sulfonamidów stosowanych klinicznie były mniej aktywne niż ich prekursorzy sulfanilamidowe [10]. Pochodna pirydyny i sulfatiazolu była najbardziej aktywna spośród testowanych związków. Aktywność tego związku wobec *S. aureus* z wartością MIC 128 µg/ml i 64 µg/ml względem *E. coli* była porównywalna do aktywności uzyskanej dla klinicznie stosowanej sulfametoksypirazyny. Związki będące pochodnymi pirazyny i 6-metoksypirazyny odpowiednio z sulfametoksypirydazyną i

⁵⁴ S. C. Shilcrat, M. K. Mokhallati, J. M. D. Fortunak, L. N. Pridgen, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 8449-8454.

⁵⁵ Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej zostały wykonane w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

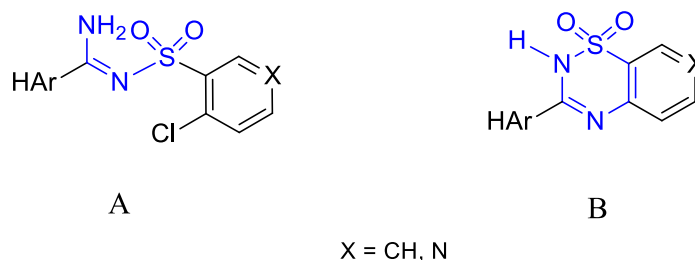
sulfatiazolem wykazały słabszą aktywność. Wartości MIC wyznaczone dla tych związków wyniosły 256 µg/ml wobec *S. aureus* i 128 µg/ml wobec *E. coli*. Pochodne pirydyny z sulfamerazyną lub sulfametoksypirydazyną wykazały aktywność wobec *E. coli* na poziomie 128 µg/ml. Nie były aktywne wobec *S. aureus*. Pochodne z pierścieniami pirydyny i 4-chloropirydyny połączone grupą amidynową z sulfatiazolem wykazały aktywność wobec *S. aureus* z MIC 256 µg/ml. Nie były natomiast aktywne wobec *E. coli*.

Badania aktywności tuberkulostatycznej wobec szczepów *M. tuberculosis* wykazały umiarkowaną i niską aktywność otrzymanych związków [9,10]. Wartości MIC dla wszystkich pochodnych zawierały się w przedziale 25-100 µg/ml. Związki będące pochodnymi pirazyny lub 6-metoksypirazyny połączonych grupą amidynową z sulfatiazolem wykazały najwyższą aktywność z wartością MIC 25 µg/ml wobec szczepu standardowego H₃₇Rv oraz odpowiednio 50 i 25 µg/ml wobec szczepu wrażliwego Spec. 192 i opornego Spec. 210 [10]. A zatem ich aktywność względem szczepu opornego była wyższa niż wobec szczepu wrażliwego.

Następnie podjęłam badania nad reaktywnością heterocyklicznych iminoestrów wobec sulfonamidów, które w położeniu *orto* do grupy sulfonamidowej mają jako podstawnik atom chloru [11,12]. Heteroaryloiminoestry poddałam reakcji z 2-chlorobenzenosulfonamidem oraz 4-chloropirydino-3-sulfonamidem. Zastosowanie takich substratów stwarza możliwość cyklizacji powstałych w pierwszym etapie reakcji sulfonamidyn (*Rysunek 16*, struktura A) do 1,1-ditlenków 1,2,4-tiadiazyn (*Rysunek 16*, struktura B) [12]. Reakcję prowadziłam jak poprzednio, w roztworze metanolu wobec niedomiaru DBU. Dla sulfonamidów prowadziło to do powstania struktur amidynowych z podstawnikiem 2-chlorobenzeno- lub 4-chloropirydino-3-sulfonowym połączonym z pierścieniem pirydyny, pirymidyny, 6-chloropirazyny lub chinoliny. Dysponując czystymi iminoestrami, pochodnymi pirazyny i 6-metoksypirazyny, reakcję otrzymywania struktur amidynowych przeprowadziłam ogrzewając równomolowe ilości reagentów przez 15 min w diglimie [11].

Użycie DBU w ilości równomolowej w stosunku do sulfonamidu, dla 2-chlorobenzenosulfonamidu prowadziło także do otrzymania struktur amidynowych. Natomiast dla 4-chloropirydino-3-sulfonamidu, produktami reakcji były odpowiednie 3-heteroarylopodstawione 1,1-ditlenki pirydo[4,3-*e*][1,2,4]tiadiazyn [12]. Zastosowanie molowej ilości DBU w przypadku 6-chloropirazynoiminoestru prowadziło do powstania łatwej do rozdzielania mieszaniny otwartej struktury amidynowej oraz

tiadiazynowej. W tym wypadku reakcji towarzyszyła wymiana atomu chloru w położeniu C-6 na ugrupowanie metoksyłowe.



Rysunek 16. Struktury otrzymanych związków: A – pochodnych sulfonamidynowych, B - 1,1-ditlenków 1,2,4-tiadiazyn

Cyklizację podstawionych amidyn z ugrupowaniem 2-chlorobenzenosulfonowym do 1,1-ditlenków 3-heteroarylo-2*H*-benzeno[*e*][1,2,4]tiadiazyn przeprowadziłam ogrzewając je we wrzącej pirydynie w obecności równomolowej ilości DBU. W samej pirydynie cyklizacja nie zachodziła. Otrzymałam także pochodną 3-fenilo-2*H*-pirydo[1,2,4]tiadiazynową. Substratem do reakcji był chlorowodorek benzenoiminoestru etylowego, który poddałam działaniu 4-chloropirydyno-3-sulfonamidu wobec nadmiaru DBU w metanolu [12].

W widmach ^1H NMR pochodnych sulfonamidynowych zaobserwowałam wszystkie sygnały dla protonów układów aromatycznych oraz dwa sygnały dla ugrupowań N-H w odległości ok. 1 ppm. Kwestię struktury tautomerycznej ponownie rozstrzygnęły badania rentgenograficzne⁵⁶ wykonane dla pochodnych 3-pirydyłowych. Dla związków tych, podobnie jak opisanych poprzednio pochodnych 2-pirydyłowych [9], badania krystalograficzne wykazały aminową strukturę tautomeryczną. A zatem, ze względu na położenie atomu azotu w pierścieniu pirydyny, tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy jednym z protonów grupy aminowej a atomem tlenu grupy sulfonowej jest, w tym wypadku, jedyną możliwą przyczyną nierównocенności magnetycznej protonów grupy aminowej i wystąpienia osobnych sygnałów w widmie ^1H NMR [11].

Dla otrzymanych pochodnych cyklicznych możliwe są dwie odmiany tautomeryczne, 2*H* i 4*H*. Aby określić, która z nich jest bardziej prawdopodobna dla związków reprezentatywnych oszacowałam całkowitą energię pojedynczych cząsteczek. Obliczenia przeprowadziłam za pomocą metod *ab initio* Hartree-Focka

⁵⁶ Badania krystalograficzne wykonane zostały w Katedrze Chemii Fizycznej Uniwersytetu Gdańskiego.

i DFT w fazie gazowej⁵⁷. Z otrzymanych danych wywnioskowałam, że tautomery 2H są energetycznie korzystniejsze [12].

Spośród otrzymanych związków 6 zostało przebadanych w kierunku aktywności tuberkulostatycznej względem *M. tuberculosis*. Były wśród nich 4 pochodne sulfonamidynowe i 2 pochodne 1,1-ditlenku 1,2,4-tiadiazyny. Wszystkie wykazały umiarkowaną i niską aktywność z wartościami MIC w zakresie 25-100 µg/ml względem wszystkich trzech szczepów: H₃₇Rv, Spec. 192 i Spec. 210. Pochodne tiadiazynowe były bardziej aktywne wobec szczepu opornego Spec. 210 (MIC 25 µg/ml) niż wobec wrażliwego Spec. 192 (MIC 50 µg/ml).

Przebadana została także aktywność pochodnych sulfonamidynowych względem bakterii beztlenowych *Propionibacterium acnes* (ATCC 11827) i *Brevibacterium linens* (ATCC 9174)⁵⁸. Wszystkie pochodne wykazały praktycznie brak aktywności z MIC >256 µg/ml względem *B. linens*. Umiarkowaną aktywność wobec *P. acnes* z w zakresie MIC 12,5-50 µg/ml wykazały 3 związki, obie sulfonamidynowe pochodne 2-pirydyłowe oraz pochodna chinoliny i 2-chlorobenzenosulfonamidu.

Związki o najwyższej aktywności względem *P. acnes* zostały następnie przebadane w kierunku aktywności cytotoksycznej względem linii komórkowej ludzkiego naskórka noworodka (ATCC PCS-201-010). Przebadane pochodne wykazały zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną. Pochodna 2-pirydyłowa z fragmentem 4-chloropirydylo-3-sulfonamidowym nie hamowała wzrostu fibroblastów w stężeniach <100 µg/ml. Pochodna 2-pirydyłowa z układem 2-chlorobenzenosulfonamidowym miała słabe działanie hamujące wzrost komórek eukariotycznych. Dla niskich stężeń związku (6,2-12,5 µg/ml) nie obserwowano efektu cytotoksycznego. W zakresie 25-100 µg/ml zaobserwowano zależność liniową pomiędzy stężeniem a efektem hamującym wzrost fibroblastów z 88% zahamowaniem wzrostu przy stężeniu 100 µg/ml. Pochodna 2-chinoliny i 2-chlorobenzenosulfonamidu wykazała silne działanie cytotoksyczne względem testowanej linii komórkowej nawet w najniższym testowanym stężeniu 6,2 µg/ml (70% zahamowania wzrostu). Uzyskane wyniki dowodzą, że aktywność przeciwbakteryjna badanych związków może mieć związek z ich działaniem cytotoksycznym.

Ze względu na wysoką aktywność cytotoksyczną pochodnej chinoliny otrzymane związki zostały przebadane w kierunku aktywności przeciwnowotworowej względem

⁵⁷ Spartan '08, Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA, 92612 USA

⁵⁸ Badania aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej zostały wykonane przez firmę Sunny BioDiscovery, Santa Paula, CA, USA.

60 linii komórkowych nowotworów ludzkich różnego pochodzenia⁵⁹. W całej przebadanej grupie 15 pochodnych wykazało aktywność przeciwnowotworową, z czego 7 związków to pochodne sulfonamidynowe. Największą aktywność przeciwnowotworową wykazała wyłoniona wcześniej pochodna chinoliny, *N'*-(2-chlorofenylsulfonylo)chinolino-2-karboksyimidoamid. Związek ten był aktywny wobec wszystkich testowanych linii komórkowych z wartością GI₅₀ (stężenie molowe hamujące w 50% wzrost komórek netto) w zakresie 0,92-13 μM. Najwyższą aktywność pochodna ta wykazała wobec komórek panelu linii białaczek. Średnia wartość GI₅₀ dla tego panelu linii komórkowych wyniosła 3,52 μM.

W ostatnim, III etapie badań, zwróciłam swoje zainteresowania w kierunku heterocyklicznego układu benzimidazolu. Kierunek ten podyktowany był doniesieniami o aktywności przeciwwirusowej⁶⁰ i przeciwdrobnoustrojowej⁶¹ związków zawierających ten fragment strukturalny. Badano ten układ również pod kątem aktywności przeciwgruźliczej. Znaczne działanie w tym kierunku wykazały pochodne 2-fenylalkilo- i 2-cykloheksyloalkilobenzimidazolu zsyntetyzowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny)⁶². Uzyskane wyniki skłoniły mnie do kontynuowania tego kierunku badawczego.

Zsyntetyzowałam struktury, w których grupa cykloheksyloetylenowa połączona jest z układem benzimidazolu (*Rysunek 17*, struktura A), układem typu benzimidazolu (naftoimidazolu, imidazopirydiny, imidazofenazyny) lub innym azotowym układem heterocyklicznym: 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionem (*Rysunek 17*, struktura B), 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionem (*Rysunek 17*, struktura C), 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyną (*Rysunek 17*, struktura D) [13].

Związki zawierające układ benzimidazolu lub układ typu benzimidazolu zostały otrzymane w reakcji kwasu 3-cykloheksylopropanowego z odpowiednimi pochodnymi i analogami 1,2-diaminobenzenu: 5-chloro-3-nitrobenzeno-1,2-diaminą, 2,3-diaminopirydyną, 2,3-diamino-5-bromopirydyną, 3,4-diaminopirydyną, 1,2-diaminonaftalenem oraz 2,3-diaminofenazyną. Syntezę prowadziłam dwiema metodami. Jedną z nich polegała na zastosowaniu kwasu polifosforowego (PPA) jako rozpuszczalnika

⁵⁹ Badania aktywności przeciwnowotworowej wykonane zostały w National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

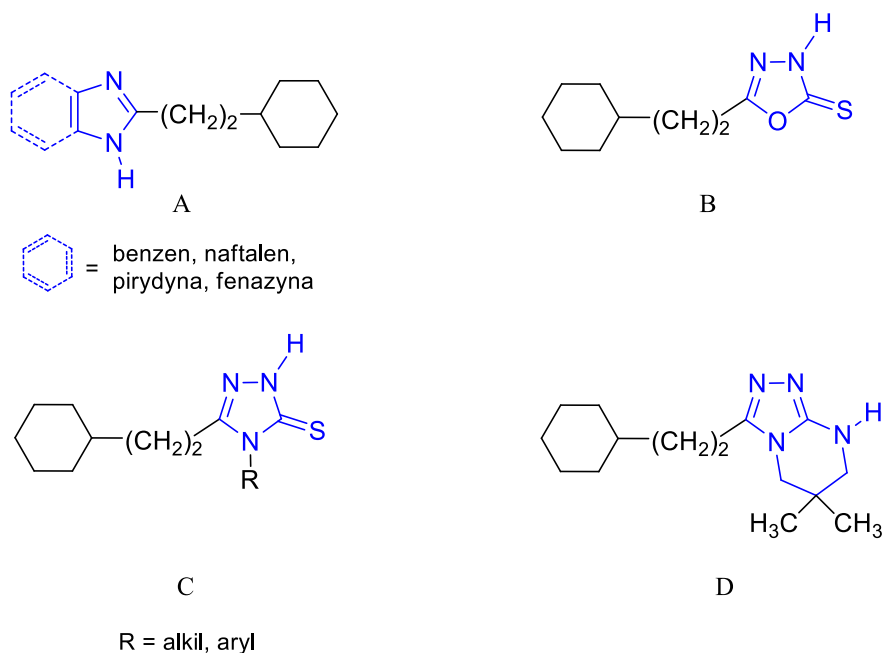
⁶⁰ S. Liu, C. A. Nelson, L. Xiao, L. Lu, P. P. Seth, D. R. Davis, C. H. Hagedorn, *Antivir. Rev.* 2011, 89, 54-63.

⁶¹ M. Tunçbilek, T. Kiper, N. Altanlar, *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 1024-1033.

⁶² H. Foks, D. Pancechowska-Ksepko, W. Kuźmierkiewicz, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć, M. Janowiec, *Khim. Geterosykl. Soed.* 2006 (5) 697-700.

o silnych właściwościach kwasowych. W drugiej metodzie substraty ogrzewałam w diglimie [13].

Z kwasu 3-cykloheksylopropanowego otrzymałam również hydrazyd, a następnie działając CS₂ w alkalicznym roztworze wodno – etanolowym pochodną 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu z podstawnikiem cykloheksyloetylenowym w położeniu C-5. Ten sam substrat w reakcji z rodankiem amonu bez rozpuszczalnika ulegał cyklizacji do 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionu. Reakcja karbohydrazdu z odpowiednimi izotiocyanianami (metylu, allilu, cykloheksyłu, 4-chlorofenyłu) prowadziła do struktur tiosemikarbazydowych. Pochodne te cyklizowałam do 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionów w 10% wodnym roztworze NaOH. Estry kwasu hydrazynokarboditiowego otrzymałam w reakcji hydrazdu kwasu 3-cykloheksylopropanowego z CS₂ i odpowiednimi haloidkami (jodkiem metylu, 1,2-dibromopropanem) w metanolowym roztworze TEA. W reakcji z 1,2-dibromoetanem zastosowałam dwukrotny nadmiar molowy TEA otrzymując 1,3-ditiolan. W przypadku *S,S'*-diestru dimetylu zastosowałam dwukrotny nadmiar, zarówno TEA jak i jodku metylu. Otrzymany *S,S'*-diester dimetylu użyłam następnie do syntezy 5,6,7,8-tetrahydro-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyny w reakcji z 1,3-diamino-2,2-dimetylopropanem [13].



Rysunek 17. Struktury otrzymanych pochodnych: A – benzimidazolu i jego analogów, B - 1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tionu, C – 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionu, D - 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyny

W widmie ^1H NMR otrzymanego 1,3-ditiolanu protony grup SCH_2 zidentyfikowałam jako dwa multiplety przy 3,45 i 3,65 ppm. Widmo ^{13}C NMR potwierdziło nierównocенność magnetyczną obu grup. Tiometylenowe atomy węgla nie dawały wspólnego sygnału lecz dwa rozsunięte przy 37,8 i 39,4 ppm.

Związki zostały przebadane w kierunku aktywności tuberkulostatycznej wobec szczepów *M. tuberculosis*: H₃₇Rv, Spec. 192 i Spec. 210. Związki benzimidazolu i typu benzimidazolu wykazały znacznie wyższą aktywność od pozostałych pochodnych. Pochodne z większymi układami skondensowanymi w miejsce benzimidazolu wykazały znakomitą aktywność tuberkulostatyczną z MIC w zakresie 1,5-3,1 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku pochodnej 1,2-diaminonaftalenu nie zaobserwowałam różnic w aktywności wobec szczepu opornego i wrażliwego. Pochodna zawierająca pierścień pirydyny w miejsce benzenu w układzie benzimidazolu i atom bromu w położeniu C-6 wykazał dobrą aktywność z wartością MIC 6,2 $\mu\text{g/ml}$. Trzy z otrzymanych pochodnych, imidazo[4,5-*b*]pirydyna, imidazo[4,5-*c*]pirydyna, 1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tion, wykazały umiarkowaną aktywność z wartościami MIC w granicach 12,5-50 $\mu\text{g/ml}$. Ich aktywność względem szczepu wrażliwego Spec.192 i opornego Spec. 210 była porównywalna. Pośród serii „benzimidazolowej” pochodna posiadająca pierścień benzenowy w układzie benzimidazolu i dwa podstawniki, atom chloru w położeniu C-6 i grupę nitrową w położeniu C-4, wykazała najslabszą aktywność z MIC 12,5 $\mu\text{g/ml}$ wobec wszystkich szczepów. Pozostałe z testowanych związków wykazały umiarkowaną aktywność przeciwgruźliczą. Uzyskane dla nich wartości MIC mieściły się w zakresie 50-100 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie związki wykazały aktywność niższą niż INH i RMP (0,5-1,1 $\mu\text{g/ml}$ i 1,2-2,5 $\mu\text{g/ml}$), ale porównywalna z aktywnością ETA (2-5 $\mu\text{g/ml}$). Większość związków była bardziej aktywna od PZA (25-400 $\mu\text{g/ml}$), stosowanego jako lek drugiego rzutu [13].

Przeprowadzona analiza zależności struktura – aktywność wykazała, że aktywność tuberkulostatyczna związków otrzymanych z kwasu 3-cykloheksylopropanowego jest związana z obecnością w cząsteczce układu benzimidazolu lub układu typu benzimidazolu. Struktury posiadające inne azotowe układy heterocykliczne, 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionu, 1,3,4-oksadiazolo-2(3*H*)-tionu lub 5,6,7,8-tetrahydro-1,2,4-pirymidyny, nie wykazały aktywności przeciwgruźliczej *in vitro*.

Wszystkie otrzymane związki wykazały niską aktywność przeciwbakteryjną (MIC >100 $\mu\text{g/ml}$) wobec bakterii beztlenowych *P. acnes* (ATCC 11827) i *B. linens*

(ATCC 9174)⁶³. Może to wskazywać na związek ich mechanizmu działania z zakłócaniem aerobowego funkcjonowania *M. tuberculosis* [13].

Najbardziej aktywne przeciwgruźliczo związki o strukturach benzimidazolu zostały przebadane w kierunku wpływu na proliferację komórek linii ludzkiego naskórka noworodka (ATCC PCS-201-010). Uzyskane wyniki wskazały na zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną w zakresie stężeń 10-100 µg/ml, od braku wpływu na proliferację dla imidazo[4,5-*c*]pirydiny poprzez efekt umiarkowanego działania pochodnej 6-chloro-4-nitrobenzimidazolu i pochodnej imidazo[4,5-*b*]fenazyny do 100% efektu cytotoksycznego dla pochodnej [4,5-*b*]pirydiny [13]. Wyniki takie wyłaniają pochodną benzimidazolu i pochodną imidazofenazyny jako związki o wysokiej aktywności tuberkulostatycznej i braku aktywności cytotoksycznej względem testowanych komórek eukariotycznych. Można je zatem uznać w badanej grupie za związki o najlepszym potencjale terapeutycznym.

Podsumowanie i wnioski

1. W pracy podjęłam tematykę dotyczącą syntezy, charakterystyki, aktywności przeciwbakteryjnej, szczególnie przeciwgruźliczej, oraz zależności struktura – aktywność nowych grup związków zawierających w swojej strukturze azotowe układy heterocykliczne pirydyny, pirymidyny, pirazyny, chinoliny i benzimidazolu. W sumie zsyntetyzowałam i scharakteryzowałam 292 nowe związki nieopisane dotąd w literaturze chemicznej. Z tej grupy 245 substancji przebadanych zostało w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej, w tym 222 pod kątem aktywności tuberkulostatycznej, a 117 w kierunku działania względem gatunków bakterii innych niż *M. tuberculosis*. Dodatkowo dla 30 związków wykonane zostały badania pod kątem aktywności przeciwnowotworowej.
2. Przeprowadzone syntezy pozwoliły ustalić nowe kierunki reakcji chemicznych, które prowadzą do otrzymania układów heterocyklicznych m.in. 5,6,7,8-teterahydro[1,2,4]triazolo[1,3-*a*]pirymidyny, 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3]tiazyny, 1,1-ditlenku 3-heteroarylo-2*H*-benzo[*e*][1,2,4]tiadiazyny i 3-heteroarylo-2*H*-pirydo[4,3-*e*][1,2,4]tiadiazyny. Pośród zsyntetyzowanych związków znalazły się również pochodne 1,2,4-triazolo-5(4*H*)-tionu z aminą cykliczną (np. morfoliną) jako podstawnikiem w położeniu N-4 tego układu. Do tej pory połączenia tego typu nie były znane.

⁶³ Badania przeciwbakteryjne i testy cytotoksyczności zostały wykonane przez firmę Sunny BioDiscovery, Santa Paula, CA, USA.

3. Dla wszystkich otrzymanych grup związków opracowałam metody syntezy umożliwiające ewentualną optymalizację warunków prowadzenia reakcji, w celu polepszenia wydajności otrzymanych produktów, co wydaje się być istotne z punktu widzenia ewentualnego wdrożenia.
4. Badania krystalograficzne pozwoliły określić budowę przestrzenną związków w stanie stałym i inne niż kowalencyjne oddziaływania występujące w ich cząsteczkach, np. wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, odpowiedzialne za przyjmowanie określonej konformacji. Badania pozwoliły również na rozwiązanie struktur przestrzennych niektórych pochodnych z sulfonamidynową grupą funkcyjną. Do tej pory dla związków z tej grupy była postulowana inna struktura tautomeryczna.
5. Wyniki aktywności tuberkulostatycznej *in vitro* pozwoliły ustalić, że spośród otrzymanych związków najbardziej aktywne są pochodne benzimidazolu (MIC 1,5-3,1 µg/ml). W tej grupie znakomitą aktywność, porównywalną z klinicznie stosowanym izoniazydem, wykazały związki posiadające podstawnik 3-cykloheksylopropylowy w pozycji C-2 pierścienia benzimidazolu lub układu typu benzimidazolu, np. nafto[2,3-*d*]imidazolu. Ich aktywność wobec szczepów opornych była porównywalna z aktywnością wobec szczepów wrażliwych. Badania cytotoksyczności nie wykazały toksycznego wpływu tych związków na komórki eukariotyczne. Brak aktywności wobec szczepów bakterii beztlenowych *P. acnes* i *B. linens* pozwala przypuszczać, że aktywność pochodnych z tej grupy może być związana z aerobowym funkcjonowaniem *M. tuberculosis*.
6. Umiarkowaną aktywność tuberkulostatyczną wykazały *S,S'*-diestry kwasu benzoiloditiokarbazowego i 1,2,4-triazole (MIC 6,2-25 µg/ml). Stwierdziłam, że aktywność tych substancji nie jest związana z planarną strukturą znacznego fragmentu cząsteczki, jak zakładałam na wstępie. W rozszerzonych badaniach *in vitro* związki z tej grupy były również aktywne wobec innych szczepów *M. tuberculosis* (m.in. An5, Wells, Kirschberg). Pochodne te nie wykazały toksyczności wobec komórek eukariotycznych.
7. Wśród związków o niższej aktywności (MIC 25-100 µg/ml) na uwagę zasługują pochodne *N*-tlenku pirazyny, które wykazały interesującą aktywność przeciwgruźliczą oraz pochodne pirazyny o umiarkowanej aktywności

przeciwbakteryjnej względem bakterii tlenowych i beztlenowych, m.in. *S aureus*, *K. pneumoniae*, *P. magnus*, *P. asaccharolyticus*.

Prowadzone przeze mnie prace naukowe, stanowiące monotematyczny cykl publikacji, finansowane były w ramach działalności własnej i statutowej Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz częściowo współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach kierowanego przeze mnie grantu nr 2011/01/B/NZ4/01187. W 2006 i 2007 roku za dorobek naukowy tego okresu mojej działalności otrzymałam dwie nagrody naukowe Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku.

Interdyscyplinarny charakter prowadzonych przeze mnie badań wymagał nawiązania współpracy krajowej i międzynarodowej z różnymi ośrodkami badawczymi, m.in. Politechniką Łódzką, Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Uniwersytetem Gdańskim, Politechniką Gdańską, firmą Sunny BioDiscovery ze Stanów Zjednoczonych oraz jednostkami Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W chwili obecnej kontynuuję temat badawczy pracując nad syntezą pochodnych i analogów benzimidazolu, które okazały się najbardziej obiecującą grupą związków. W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałam kilka substancji będących dobrymi kandydatami na leki przeciwgruźlicze. Związki te charakteryzują się najlepszym potencjałem terapeutycznym. Dla wyłonionych w wyniku przeprowadzonego farmakoskriningu substancji zaplanowałam dalszy etap badań, tj. testy *in vivo* na modelu myszy CD-1. Zakładam, że poszerzenie grupy benzimidazoli o kolejne modyfikacje strukturalne pozwoli określić elementy struktury odpowiedzialne za ich aktywność przeciwgruźliczą, a w dalszej perspektywie, wyjaśnić mechanizm ich działania, co po części jest przedmiotem kierowanego przeze mnie grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2011/01/B/NZ4/01187, pt. „Poszukiwanie związków o aktywności przeciwgruźliczej w grupie pochodnych i analogów benzimidazolu”.

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

- **Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych**

W ramach studiów doktoranckich zajmowałam się badaniem mechanizmów aktywności pochodnych i analogów antrachinonu wobec komórek nowotworowych o oporności wielolekowej. Kierunek badawczy realizowałam poprzez:

- ✓ określenie właściwości fizykochemicznych związków, m.in. wyznaczenie pKa, log P,
- ✓ badanie oddziaływania związków z DNA eukariotycznym,
- ✓ badanie transportu związków do komórki w oparciu o metody spektrofluorymetryczne,
- ✓ badanie powinowactwa związków do organelli komórkowych w oparciu o mikroskopię konfokalną,
- ✓ badanie możliwości przywracania aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* antybiotyków antracyklinowych wobec komórek opornych poprzez skojarzone podawanie z testowanymi związkami.

Prowadzone przeze mnie badania finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu naukowo-badawczego nr 4 P05A 062 16, pt. „Badanie mechanizmu aktywności cytotoksycznej nowych pochodnych i analogów antrachinonu aktywnych na linie komórek nowotworowych o oporności wielolekowej z superekspresją białek transportujących ABC” realizowanego w latach 1999-2001, którego byłam wykonawcą. W 1996 roku Ambasada Republiki Francuskiej w Warszawie podjęła decyzję o finansowaniu wspólnego francusko-polskiego projektu naukowo-technologicznego nr 6609 pt. „Molecular basis for the rational design of anthraquinone antitumour agents active on multi-drug resistant tumour cells with ATP-binding cassette transport proteins”, w którym pełniłam rolę wykonawcy. W 1997 roku otrzymałam stypendium Rządu Francuskiego (Bourse du Gouvernement Français). W ramach tego stypendium od września do grudnia 1998 r. pracowałam w Laboratoire de Physicochimie Biomoléculaire et Cellulaire, Université Paris-Nord. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań zostały opublikowane w 4 artykułach pełnotekstowych i 10 komunikatach zjazdowych, z czego 3 artykuły pełnotekstowe i 2 komunikaty na konferencjach zagranicznych zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Jeden artykuł został wydany w 1998 r. w *Anti-Cancer Drug Design* (IF 1,692, KBN 10).

- **Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych**

Współpraca naukowa

1. W ramach zadań statutowych Katedry i Zakładu Chemii Organicznej prowadzonych pod kierunkiem kierownika prof. dr. hab. Henryka Foksa, zajmowałam się syntezą nowych pochodnych pirazyny i pirydyny, w tym

- 2-heteroarylo-1,2,4-triazoli, 2-heteroarylo-1,3,4-oksadiazoli oraz 2-aminoheteroarylo-1,3,4-tiadiazoli. Wyniki tych badań opublikowałam w 5 artykułach pełnotekstowych. Współpracę z prof. Foksem kontynuuję do dnia dzisiejszego. W sumie opublikowałam w ramach tej współpracy 13 artykułów naukowych (IF = 9,669) i 10 streszczeń zjazdowych.
2. W ramach współpracy z prof. dr hab. Ewą Augustynowicz-Kopeć z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc prowadzę badania nad poszukiwaniem nowych pochodnych stosowanych tuberkulostatyków, izoniazydu i pirazynamidu o potencjalnej aktywności przeciwgruźliczej. Dotychczasowe wyniki badań zostały opublikowane w 5 pełnotekstowych artykułach naukowych (IF = 4,09) i 6 komunikatach konferencyjnych. Obecnie nasza współpraca opiera się o realizację projektu badawczego pod moim kierunkiem (grant Narodowego Centrum Nauki) nr 2011/01/B/NZ4/01187, pt.: "Poszukiwanie związków o aktywności przeciwgruźliczej w grupie pochodnych i analogów benzimidazolu", z terminem realizacji w latach 2011-2014.
 3. W ramach współpracy z prof. dr. hab. Markiem L. Główką z Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej prowadzę badania nad zależnością struktura – aktywność przeciwgruźlicza dla grupy pochodnych kwasu hydrazynokarboditiowego. Głównym celem badań było potwierdzenie roboczej hipotezy na temat korelacji pomiędzy aktywnością związków z tej grupy a planarnością znacznego fragmentu ich struktury. Temat współpracy był przedmiotem grantu badawczego KBN nr N N204 111735, pt: „Nowe tuberkulostatyki działające na lekooporne szczepy *Mycobacterium tuberculosis*. Synteza, struktura i aktywność”, z termin realizacji w latach 2008-2011. Do tej pory w ramach tego tematu badawczego ukazały się 4 artykuły pełnotekstowe (IF = 2,072). Prof. Marek Główka jest również głównym wykonawcą kierowanego przeze mnie grantu NCN.
 4. W ramach współpracy z dr Marią Dąbrowską-Szponar z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadziłam badania nad poszukiwaniem aktywnych chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych w grupie sulfonamidynowych pochodnych pirazyny i pirydyny. Uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w 1 pełnotekstowym artykule naukowym (IF = 1,243).

5. W ramach współpracy z dr hab. Markiem Koniecznym z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego brałam udział w realizacji grantu Komitetu Badań Naukowych nr 2 P05F 055 28, pt: "Nowe pochodne chalkonu: synteza i wielokierunkowa ocena przydatności farmakologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności wobec komórek nowotworowych i wielolekoopornych", z terminem realizacji w latach 2005-2007.
6. W ramach współpracy z dr hab. Anną Kędzą, prof. GUMed, kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Jamy Ustnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadzę badania dotyczące poszukiwania nowych potencjalnych chemoterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych z grupy pochodnych pirazyny i pirydyny aktywnych wobec klinicznych szczepów bakterii chorobotwórczych. Uzyskane wyniki badań zostały upowszechnione w postaci 4 komunikatów zjazdowych.
7. W ramach współpracy z dr. Krzysztofem Bojanowskim z firmy Sunny BioDiscovery z Santa Paula, CA, USA prowadzę badania nad poszukiwaniem związków heterocyklicznych aktywnych wobec szczepów bakterii patogennych wywołujących infekcje skórne oraz bakterii beztlenowych odpowiedzialnych za zakażenia w obrębie jamy ustnej. Artykuł naukowy prezentujący wyniki tej współpracy został wysłany do redakcji *European Journal of Medicinal Chemistry*.
8. W ramach współpracy z dr. Arturem Sikorskim z Katedry Chemii Fizycznej Uniwersytetu Gdańskiego prowadzę badania nad prototropową tautomerią sulfonamidynowej grupy funkcyjnej. Badania obejmują analizę struktury krystalograficznej związków i identyfikację elementów strukturalnych odpowiedzialnych za ich równowagę tautomeryczną.

Kierowanie projektami badawczymi

W latach 2005-2010 realizowałam w charakterze kierownika 2 prace własne finansowane przez Akademię Medyczną w Gdańsku, a następnie Gdański Uniwersytet Medyczny: „Synteza nowych heterocyklicznych pochodnych amidoksymów o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej” i „Synteza nowych heterocyklicznych pochodnych 1,2,4-triazolu o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej”. W grudniu 2011 r. przyznano mi kierownictwo trzyletniego grantu Narodowego

Centrum Nauki nr 2011/01/B/NZ4/01187, pt. „Poszukiwanie związków o aktywności przeciwgruźliczej w grupie pochodnych i analogów benzimidazolu”.

Wygłoszone referaty naukowe

Referat pt: „Synteza nowych pochodnych amidoksymów o potencjalnym działaniu biologicznym” na XXII Sesji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk, 16 grudnia 2003 r.

Recenzje publikacji naukowych

1. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 2010 (IF = 1,357): publikacja dotycząca nowego szlaku syntetycznego umożliwiającego otrzymywanie pochodnych triazolu, pirazolu, tiazolu, pirydyny i chromanu z 1-cjano-4-(4-etoksyfenylo)tiosemikarbazydu.
2. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2011 (IF = 1,22): publikacja dotycząca syntezy nowych pochodnych 5-(2*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-4,5-dihydroizoksazolu na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji.
3. *Letters in Drug Design & Discovery* 2012 (IF = 0,872): artykuł dotyczący wpływu podstawnika w pozycji N-4 nowych hydroksymetylowych i aminometylowych pochodnych 1,2,4-triazolo-3-tionu na ich aktywność przeciwbakteryjną.
4. *Letters in Drug Design & Discovery* 2012 (IF = 0,872): praca naukowa dotycząca nowej klasy pochodnych triazolu i ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej.
5. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2012 (IF = 1,22): publikacja dotycząca syntezy i aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych *N*-podstawionych 5-arylideno-tiazolidyno-2,4-dionów.
6. *Archiv der Pharmazie* 2012 (IF = 1,708): praca nt. syntezy pochodnych 1-*N'*-podstawionych tiokarbamoilo-3,5-dienylo-4,5-dihydro-(1*H*)-pirazolu oraz oceny ich działania hamującego funkcjonowanie ludzkiej monoaminooksydazy.
7. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012 (IF = 2,554): publikacja nt. syntezy i oceny chalkonów otrzymywanych z β -jononów jako aktywnych związków przeciwdrobnoustrojowych.

8. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012 (IF = 3,346): artykuł dotyczący identyfikacji aktywności biologicznej, w tym przeciwzapalnej, pochodnych 3-karboamidu i 3-karbohidrazynu gatifloksacyny.
9. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012 (IF = 2,554): publikacja nt. syntezy i oceny biologicznej pochodnych 5-aryloksypirazolu posiadających kwas rodanino-3-aromatyczny jako potencjalnych czynników przeciwdrobnoustrojowych.
10. *Molecules* 2012 (IF = 2,386): praca nt. syntezy i aktywności przeciwbakteryjnych nowych związków heterocyklicznych, pochodnych pirazolu, pirydazyny, oksazolu, zawierających ugrupowanie sulfonamidowe.
11. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012 (IF = 3,346): artykuł dotyczący syntezy i aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej nowych pochodnych tiomocznika z fragmentem kwasu hipurowego.
12. *International Journal of Molecular Sciences* 2012 (IF = 2,598): publikacja nt. syntezy nowych α,β -nienasyconych ketonów i otrzymywanych z nich związków heterocyklicznych o spodziewanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.
13. *Letters in Drug Design & Discovery* 2012 (IF = 0,872): artykuł nt. syntezy i aktywności biologicznej nowych podstawionych pochodnych (3*E*,5*E*)-3,5-diarylideno-1-fenetylopiperydyno-4-onu.
14. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013 (IF = 3,346): artykuł dotyczący syntezy i aktywności biologicznej nowych 2-podstawionych pochodnych amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-ylo-metylochiazolin-4(3*H*)-onu.

Otrzymane nagrody naukowe

1. W roku 2006 otrzymałam zespołową nagrodę naukową I-go stopnia Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za badania nad syntezą nowych związków heterocyklicznych o potencjalnej aktywności tuberkulostatycznej.
2. W roku 2007 otrzymałam zespołową nagrodę naukową II-go stopnia Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za badania nad syntezą i aktywnością przeciwbakteryjną nowych azotowych związków heterocyklicznych.

6. Dorobek naukowy – publikacje pełnotekstowe

1. Łączna liczba publikacji pełnotekstowych wynosi 34 w tym 29 artykułów naukowych (Załącznik Nr 3 – Wykaz dorobku naukowego) o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF = 36,463$ (557,5 KBN/MNiSW).
2. Łączna liczba publikacji pełnotekstowych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora wynosi 33 w tym 28 artykułów naukowych (Załącznik Nr 3 – Wykaz dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora) o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF = 34,771$ (547,5 KBN/MNiSW).
3. Liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science wynosi 96.
4. Indeks Hirscha publikacji wg bazy Web of Science wynosi 5.

Katarzyna Gobis