



Daniel Szulczyk

Autoreferat

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2021

1. Imię i nazwisko

Daniel Szulczyk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2008r. – dyplom magistra chemii, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Związków Naturalnych, tytuł pracy magisterskiej: „Zastosowanie modyfikowanych borowodorków w stereoselektywnej redukcji 1-metylo-2-aryloetylideno-1-fenylloetyloamin”, promotor: Prof. dr hab. Zbigniew Czarnocki.

2013r. - stopień doktora nauk farmaceutycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie wybranych układów heterocyklicznych do syntezy aktywnych biologicznie pochodnych tiomocznikowych”, promotor: Prof. dr hab. Marta Struga

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 06.2018 – adiunkt (1/2 etatu), Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

W 2013 roku nie przedłużono ze mną umowy, ponieważ Katedra i Zakład Chemii Medycznej WUM zostały rozwiązane. W związku z zaistniałą sytuacją, podjąłem pracę w firmie SciencePharma/HealthMed, następnie w Boehringer Ingelheim. W latach 2014 – 2017 kontynuowałem jednocześnie pracę naukową (wolontariat) na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Obecnie pracuję jednocześnie w firmie farmaceutycznej MSD Polska na stanowisku Market Access Manager (etat) oraz w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Wydziału Lekarskiego WUM na stanowisku adiunkt (1/2 etatu).

10.2008 – 08.2013 – asystent (etat), Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Reakcje desulfuryzacji i cyklizacji pochodnych tiosemikarbazydu oraz tiomocznika – wpływ zmian strukturalnych na aktywność biologiczną.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

H1. Szulczyk D*, Tomaszewski P, Józwiak M, Koziół AE, Lis T, Collu D, Iuliano F, Struga M. Synthesis and Biological Activities of Ethyl 2-(2-pyridylacetate) Derivatives Containing Thiourea, 1,2,4-triazole, Thiadiazole and Oxadiazole Moieties. *Molecules*. 2017 Mar 6;22(3):409.

IF = 3.098. Punkty MNiSW = 30.

H2. Szulczyk D*, Dobrowolski MA, Roszkowski P, Bielenica A, Stefańska J, Koliński M, Kmiecik S, Józwiak M, Wrzosek M, Olejarz W, Struga M. Design and synthesis of novel 1H-tetrazol-5-amine based potent antimicrobial agents: DNA topoisomerase IV and gyrase affinity evaluation supported by molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018 Aug 5; 156:631-640.

IF = 4.833. Punkty MNiSW = 40.

H3. Szulczyk D*, Bielenica A, Roszkowski P, Dobrowolski MA, Olejarz W, Napiórkowska M, Struga M. Cytotoxicity Evaluation of Novel bis(2-aminoethyl)amine Derivatives. *Molecules*. 2020 Jun 18;25(12):2816.

IF = 3.267. Punkty MNiSW = 100.

H4. Szulczyk D, Bielenica A, Głogowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Dobrowolski M, Roszkowski P, Stępień K, Chrzanowska A, Struga M. Development of (4-methoxyphenyl)-1H-tetrazol-5-amine regioisomers as a new class of selective antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 15; 186:111882.

IF = 5.573. Punkty MNiSW = 140.

H5. Szulczyk D*, Bielenica A, Roszkowski P, Dobrowolski MA, Olejarz W, Kmiecik S, Podsiad M, Struga M. Synthetic Transition from Thiourea-Based Compounds to Tetrazole Derivatives: Structure and Biological Evaluation of Synthesized New N-(Furan-2-ylmethyl)-1H-tetrazol-5-amine Derivatives. *Molecules*. 2021; 26(2):323.

IF = 3.267. Punkty MNiSW = 100.

* – prace, w których występowałem w roli autora korespondencyjnego

Sumaryczny IF cyklu wynosi 20.038. Suma punktów MNiSW cyklu wynosi 410.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie i cel naukowy prowadzonych badań

Obecnie jednymi z największych obaw, związanych ze zdrowiem budzi wzrost oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe na świecie, który może zaprzepaścić ogromne korzyści, jakie przyniosło odkrycie penicyliny i innych antybiotyków. Naciągające nieuchronnie przejście do końca „ery antybiotykoterapii”, w której pospolite zakażenia staną się ponownie śmiertelne może okazać się katastrofalne. Szacuje się, że 25.000 osób w UE umiera rocznie z powodu infekcji wywołanych drobnoustrojami. Wraz ze wzrostem AMR (antimicrobial resistance) groźba powszechnych infekcji staje się poważna. Brak działań w sprawie tego poważnego zagrożenia, może spowodować zgon miliona osób rocznie¹. Należy nadmienić, że obecnie szczególnie dużym zagrożeniem stała się metycylino-oporność wobec szczepów gronkowca skórniego i złocistego (MRSE oraz MRSA). Zmagamy się również z opornością *Mycobacterium tuberculosis* na leki przeciwprątkowe, podobnie jak innych gatunków drobnoustrojów, w wyniku selekcji mutantów naturalnie opornych, stale obecnych w każdej populacji bakterii². Do zakażeń drobnoustrojami często dochodzi w szpitalach. Czas leczenia takich zakażeń jest o wiele dłuższy i wymaga w wielu wypadkach terapii więcej niż jedną substancją czynną. Oprócz aspektów klinicznych, należy zwrócić na te ekonomiczne. Brak skutecznego leku to wydłużony czas leczenia, zwiększony koszt używania wielu substancji czynnych oraz koszty pośrednie ośrodka, w którym przebiega leczenie.

Struktury tiosemikarbazydu oraz tiomocznika są często wykorzystywanymi motywami budulcowymi w chemii medycznej. Ze względu na swoje właściwości, ich liniowe pochodne mogą stanowić docelowe związki o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Jednak optymalnie zaplanowana synteza takich związków zwykle nie kończy się na tym etapie. Istnieje szereg reakcji, które wykorzystują pochodne tiosemikarbazydu oraz tiomocznika jako substraty. Spośród nich można wyodrębnić reakcje desulfuryzacji i/lub cyklizacji prowadzące do utworzenia heterocyklicznych pierścieni takich jak oksadiazol, triazol czy tiadiazol. Duża ilość dostępnych transformacji syntetycznych jest niewątpliwą zaletą pochodnych

1 Antimicrobial resistance (AMR) - Publications Office of the EU, ISBN 978-92-9200-811-6.

2 Klatt M, Zwolska Z, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E. Wiarygodność testów lekooporności *Mycobacterium tuberculosis* jako istotny element nadzorowanego leczenia gruźlicy. Postępy Nauk Medycznych, 2011;XXIV(10):811-818.

tiosemikarbazydu oraz tiomocznika, jak również szeroki zakres ich bioaktywności^{3,4}. Można przyjąć podczas projektowania syntezy, że cykliczna pochodna będzie reprezentować przynajmniej podobny poziom określonej aktywności biologicznej jak jej liniowy odpowiednik. Częściowym wytłumaczeniem tego zjawiska jest usztywnienie cząsteczki w wyniku powstawania pierścienia heterocyklicznego oraz zmiany w rozmieszczeniu gęstości elektronowych w jego obrębie. Biorąc powyższe pod uwagę oraz liczne doniesienia z piśmiennictwa opisujące aktywność mikrobiologiczną pochodnych tiosemikarbazydu oraz tiomocznika, zasadnym jest poszukiwanie w tej grupie nowych związków przeciwdrobnoustrojowych o potencjale farmakologicznym.

Głównym celem mojej pracy badawczej było zaprojektowanie, synteza oraz koordynacja wielośrodkowych badań nad pochodnymi tiosemikarbazolu i tiomocznika. Należy podkreślić, że koncentrowałem się głównie na otrzymaniu cyklicznych pochodnych. Syntezę zaprojektowałem jednak tak, aby móc porównać cykliczne pochodne tiosemikarbazydu i tiomocznika względem ich liniowych prekursorów pod kątem właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. W toku prac, udało mi się wyłonić najbardziej obiecującą grupę związków zawierającą w swojej strukturze pierścień tetrazolu. Koncentrując uwagę na tej grupie, wybrałem najbardziej aktywne związki, dla których wykonano poszerzone eksperymenty biologiczne w celu ustalenia ich mechanizmu działania. Wyniki mojej pracy są zawarte w przekazanym do oceny osiągnięciu naukowym składającym się z cyklu 5 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 – 2021.

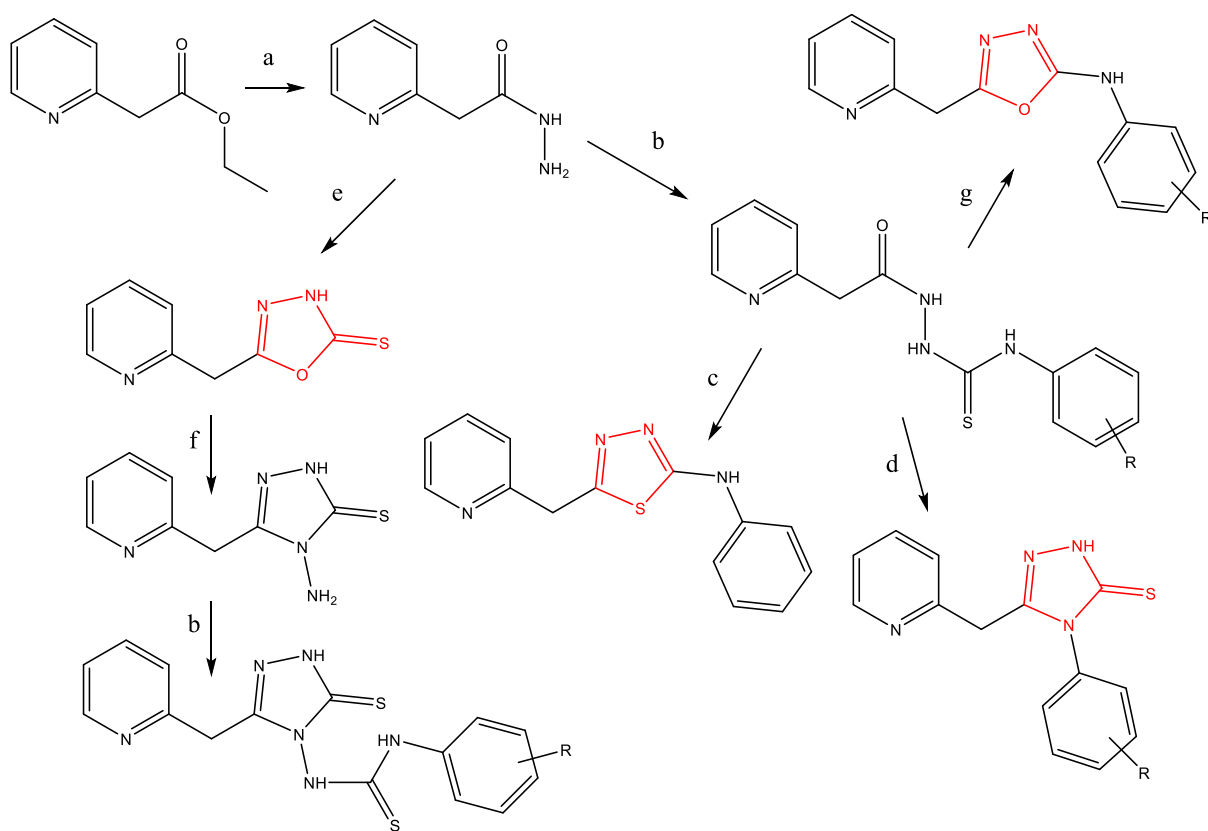
Omówienie wyników badań

Mój pierwszy projekt badawczy był związany z określeniem aktywności biologicznej cyklicznych pochodnych tiosemikarbazydu. Na tym etapie zaprojektowałem oraz wykonałem syntezę 36 związków. Otrzymane związki bazują na szkielecie 2-(2-pirydylooctanu) etylu. W celu otrzymania substratu dla docelowych związków, bazowy szkielet został przekształcony w tiosemikarbazydową pochodną. W wyniku przeprowadzonych reakcji cyklizacji i/lub desulfuryzacji otrzymałem finalne związki zawierające trzy pięcioczłonowe pierścienie heterocykliczne: 1,2,4-triazolu, 1,3,4-tiadiazolu oraz 1,3,4-oksadiazolu (**H1**). Za

3 Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem*. 2004 Jan;4(1):31-9.

4 Bogatskii AV, Luk'yanenko NG, Kirichenko, TI. Cyclic thioureas (review). *Chem Heterocycl Compd*. 1983;19:577–589.

prawidłowością planu syntetycznego przemawiały wcześniejsze rezultaty zespołu badawczego, jak i prezentowane wyniki innych autorów^{5,6}. Z uwagi na wysoki poziom zróżnicowania otrzymanych związków (**Rys 1.**) spodziewałem się wyłonić struktury wiodące do dalszych syntez i badań. Należy podkreślić, że wszystkie związki cykliczne zawierają te same fragmenty fluorowcofenylowe (R). Stwarza to możliwość wyciągnięcia wniosków dotyczących wpływu wprowadzonego pierścienia heterocyklicznego na aktywność danego związku. Zastosowane reakcje cyklizacji są w większości bardzo dobrze znane i szeroko stosowane. Na uwagę zasługuje otrzymanie tożsamyh układów heterocyklicznych 1,3,4-oksadiazol-2(3H)-tionu (cyklizacja) i 1,3,4-oksadiazolu (cyklizacja i desulfuryzacja).



R; **1)** 3-Cl, 4-Cl, **2)** 3-Cl, 4-CH₃, **3)** 3-CF₃, **4)** 3-Br, **5)** 3-Cl, **6)** 3-Cl, 4-F, **7)** 2-Cl, 3-CH₃.

Rys. 1. Synteza cyklicznych pochodnych N-(fenylopodstawionych)-2-(pirydyn-2-yl)ocetylo)hydrazynokarbotoamidów. Warunki reakcji: a) NH₂NH₂ 80%, EtOH, 2 h, b)

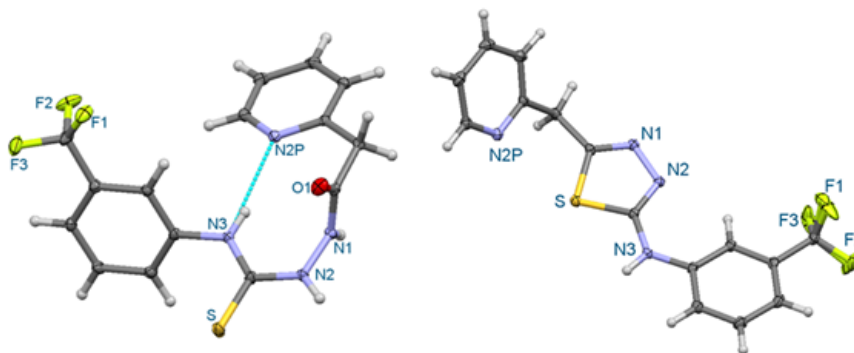
5 El-Emam AA, Al-Deeb OA, Al-Omar M, Lehmann J. Synthesis, antimicrobial, and anti-HIV-1 activity of certain 5-(1-adamantyl)-2-substituted thio-1,3,4-oxadiazoles and 5-(1-adamantyl)-3-substituted aminomethyl-1,3,4-oxadiazoline-2-thiones. *Bioorg Med Chem.* 2004 Oct 1;12(19):5107-13.

6 Salgin-Gökşen U, Gökhan-Kelekçi N, Göktaş O, Köysal Y, Kiliç E, Işık S, Aktay G, Ozalp M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem.* 2007 Sep 1;15(17):5738-51.

odpowiedni izotiocyanian, acetonitryl, ogrzewanie, 6 h, c) H₂SO₄(st.), d) 2% NaOH, ogrzewanie, 1 h, e) KOH, EtOH, CS₂ f) NH₂NH₂ 80%, ogrzewanie, g) Et₃N, HgCl₂, DMF.

Monohalogeno- i dihalogeno- pochodne fenyłowe stanowiły zwartą grupę podstawników reprezentującą podobne właściwości fizykochemiczne. Elektronoakceptorowe podstawniki mają charakter dezaktywujący. Wprowadzenie do pierścienia atomu chlorowca powoduje też zwiększenie kwasowości związku, co ma swoje przełożenie na takie parametry, jak na przykład rozpuszczalność związku. Ma to istotne znaczenie w kontekście prawidłowego oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone za pomocą widm spektralnych. Dodatkowo, zostały wykonane eksperymenty dla monokryształów wybranych związków dzięki współpracy z Prof. dr hab. Anną E. Kozioł z Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz Prof. dr hab. Tomaszem Lisem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W rezultacie otrzymano dane krystalograficzne dla czterech przedstawicieli zsyntetyzowanych struktur pochodnych: tiosemikarbazydu, 1,2,4-triazolu, 1,3,4-tiadiazolu oraz 1,3,4-oksadiazolu. W przypadku uzyskania par substrat-produkt (**Rys. 2.**) istnieje możliwość porównania ich właściwości w ciele stałym oraz dokonania próby powiązania zmian strukturalnych ze zmianą aktywności biologicznej.



Rys. 2. Rzuty perspektywiczne struktur molekularnych 2-(pirydyno-2-yloacetylo)-N-[3-(trifluorometylo)fenylo]hydrazynokarbatioamidu i 5-((pirydyno-2-ylometylo)-N-[3-(trifluorometylo)fenylo]-1,3,4-tiadiazol-2-aminy.

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostało przeprowadzone w ramach współpracy z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Wszystkie zsyntetyzowane związki zostały przekazane na badania *in vitro* przeciwko wielu standardowym szczepom bakterii gram-dodatnich, gram-ujemnych i grzybów. Mikroorganizmy zastosowane w tym badaniu używa się powszechnie w testach

przeciwdrobnoustrojowych dla wielu substancji, takich jak antybiotyki czy leki antyseptyczne⁷. Procedura badawcza rozpoczęła się od wstępnego badania przesiewowego metodą krążkowo-dyfuzyjną. Pomimo różnorodności strukturalnej badanych związków oraz wspomnianych wcześniej doniesień literaturowych dla podobnych związków, wszystkie zsyntetyzowane pochodne okazały się być nieaktywne w przeprowadzonym badaniu. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa^{8,9,10} zdecydowano się na dokonanie szerszej oceny aktywności biologicznej 21 syntetyzowanych związków. Przy współpracy z Prof. Paolo La Colla z Wydziału Nauk o Życiu i Środowisku, Sekcji Mikrobiologii i Wirusologii Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech wykonano badanie w kierunku aktywności przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności typu 1 (HIV-1), stosując efavirenz jako inhibitor referencyjny. Równolegle oceniano cytotoksyczność wobec komórek MT-4. Żaden z badanych związków nie wykazał selektywnej aktywności anti-HIV-1. Związki biorące udział w badaniu były niecytotoksyczne wobec komórek MT-4 ($CC_{50} > 100 \mu M$).

Biorąc pod uwagę rezultaty przedstawione powyżej, zdecydowałem się na zrezygnowanie z tiosemikarbazydowych pochodnych jako substratów w dalszych pracach syntetycznych. Jednocześnie kontynuowałem tematykę badawczą w kierunku uzyskiwania związków o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym. W 2018 roku opublikowałem pracę w *European Journal of Medicinal Chemistry* (**H2**) stanowiącą efekt zmiany strategii syntetycznej. Dokonałem zmiany centralnego fragmentu cząsteczki na mniej zbadany pięcioczłonowy pierścień tetrazolowy. Z uwagi na ograniczoną ilość publikacji dotyczących związków o działaniu przeciwko szczepom bakterii, których centralnym szkieletem strukturalnym jest pierścień tetrazolowy, postanowiłem zaprojektować otrzymanie związków na bazie prekursora o potwierdzonej w literaturze kierunkowej aktywności. Naturalnym okazał się wybór do badań 1,3-dipodstawionych tiomocznikowych pochodnych ze względu na wieloletnie doświadczenie pracy zespołu oraz ilość doniesień naukowych. Stanowiły one materiał wyjściowy do wprowadzenia pierścienia tetrazolu i zbadania efektu takiej modyfikacji

7 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 2004; Approved Guideline. NCCLS document M44-A; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA, 2009.

8 Li Z, Cao Y, Zhan P, Pannecouque C, Balzarini J, De Clercq E, Liu X. Synthesis and anti-HIV evaluation of novel 1,2,4-triazole derivatives as potential non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Lett Drug Des Discov.* 2016;10:27–34.

9 Hajimahdi Z, Zarghi A, Zabihollahi R, Aghasadeghi MR. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of new 1,3,4-oxadiazole- and 1,3,4-thiadiazole-substituted 4-oxo-4Hpyrido[1,2-a]pyrimidines as anti-HIV-1 agents. *Med Chem Res.* 2013;22:2467–2475.

10 El-Sayed WA, El-Essawy FA, Ali OM, Nasr BS, Abdalla MM, Abdel-Rahman AA. Anti-HIV activity of new substituted 1,3,4-oxadiazole derivatives and their acyclic nucleoside analogues. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2009 Nov-Dec;64(11-12):773-8.

strukturalnej. Schemat reakcji oraz różnorodność strukturalna otrzymanych pochodnych została zobrazowana w Tabeli 1.

Związek nr	R ₁	R ₂	Związek nr	R ₁	R ₂
1			8		
2			9		
3			10		
4			11		
5			12		Etyl
6			13		
7			14		

Tabela 1. Schemat reakcji i struktury zsyntetyzowanych 1,5-dipodstawionych tetrazoli.

Pierwsze pochodne tetrazolu zostały zsyntetyzowane w 1885 roku, jednak do 1950 roku ten rodzaj związków nie cieszył się dużym zainteresowaniem. W ostatnich latach opracowano szeroką gamę technik syntetycznych, a część z nich związanych jest z chemią pierścienia tetrazolowego i jego zastosowaniem¹¹. Kilka bardzo skutecznych leków, których substancje czynne zawierają pierścień tetrazolu są dostępne na rynku. Przykładami są Losartan, Valsartan, Irbesartan, Flomoxef i Cefonicid. Pierwsze trzy leki są stosowane głównie w leczeniu wysokiego ciśnienia krwi (nadciśnienia), kolejne dwa to półsyntetyczne antybiotyki cefalosporyny. Pierścień tetrazolowy jest powtarzającym się motywem we wszystkich wymienionych lekach, ale bardziej jako modyfikacja centralnego rdzenia cząsteczki. W pozycji 1 i/lub 5 pierścienia tetrazolowego są dołączone podstawniki, które zwiększają rozpuszczalność związku (np. -sulfometylo w Cefonicid). Z drugiej strony pozycje 1 i/lub 5 tetrazolu mogą być zajęte przez fenylowe, benzoilowe pierścienie z grupami -NO₂, -Cl, -Br, -F w celu poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Stwierdzono, że przyłączenie pierścienia tetrazolowego do szkieletu centralnego cząsteczki stosunkowo często prowadzi, nie tylko do zwiększenia aktywności biologicznej, ale także do wydłużenia czasu działania leku. Z reguły nie towarzyszy temu wzrost toksyczności¹². Według ograniczonych danych z piśmiennictwa, niektóre pochodne tetrazolu posiadają właściwości przeciwbakteryjne^{13,14,15}.

Projektując syntezę zauważyłem, że małe cząsteczki oparte na tetrazolu nie były badane, zwłaszcza jako substancje przeciwdrobnoustrojowe. Należy podkreślić, że większość opublikowanych struktur była złożona, a pierścień tetrazolu nie był elementem centralnym cząsteczki. Przeprowadzone przez nasz Zespół badania koncentrowały się na małych cząsteczkach na bazie tetrazolu, a naszym głównym celem była ocena ich potencjału w walce z lekoopornymi szczepami bakteryjnymi. Wszystkie 1,5-dipodstawione tetrazole (**Rys. 1.**) otrzymałem za pośrednictwem reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją 1,3-dipodstawionych tiomoczników. Azydek sodu jako zewnętrzny nukleofil umożliwiający cyklizację oraz chlorek rtęci (II) jako odczynnik „odsiaarczający”, zostały użyte do otrzymania każdej z pochodnych tetrazolowych. Reakcje przeprowadzałem w temperaturze pokojowej w dimetyloformamidzie (DMF) oraz w obecności katalitycznych ilości trietyloaminy. Wszystkie związki uzyskano w dobrych lub bardzo dobrych ilościach (wydajność reakcji 48 – 86 %).

11 Myznikov LV, Hrabalek, A, Koldobskii, GI. Drugs in the tetrazole series. (Review). Chem Heterocycl Compd. 2007;43:1–9.

12 Ostrovskii VA, Koldobskii GI, Trifonov RE. Comp Heterocycl Chem. 2008;6:257–423.

13 Moustafa MA, El-Sherbeny MA, El-Sherbiny DT, El-Sayed SM. J Am Sci. 2012;8:973–986.

14 Morjan RY, Al-Atter NH, Abu-Teim OS, Ulrich M, Awadallah AM, Mkadmh AM, Elmanama AA, Raftery J, Abu-Awwad FM, Yaseen ZJ, Elqidrea AF, Gardiner JM. Bioorg Med Chem. 2015;25:4024–4028.

15 Jo YW, Im WB, Rhee JK, Shim MJ, Kim WB, Choi EC. Bioorg Med Chem. 2004;12:5909-5915.

Struktury związków zostały scharakteryzowane przy użyciu różnych metod spektroskopowych (^1H NMR, ^{13}C NMR i MS). Dodatkowo struktura związku 1-(4-nitrofenylo)-N-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)-1*H*-tetrazol-5-aminy została zbadana techniką krystalografii rentgenowskiej. Było to możliwe dzięki zawiązanej współpracy z dr Michałem Dobrowolskim z Pracowni Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Podobnie jak w wypadku poprzedniej pracy badawczej, badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostało przeprowadzone w ramach współpracy z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Wszystkie zsyntetyzowane związki zostały przebadane *in vitro* w kierunku aktywności wobec szczepom bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Dla wszystkich związków zostały wyznaczone ich minimalne stężenia hamujące (MIC). Wyniki wykazały, że 13 z 14 badanych związków wykazywało wysoką i szeroką aktywność przeciwbakteryjną, szczególnie w przypadku standardowych szczepów *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*. W tej grupie obserwowane wartości MIC mieściły się w zakresie od 1 do 208 μM (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$). Dwa związki **10** i **11** były aktywne przeciwko wszystkim badanych szczepom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym w zakresie od 1 do 208 μM (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$). Pochodna **11** działała silniej aniżeli cyprofloksacyna (związek referencyjny) na standardowe szczepy bakterii *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. vulgaris*. Minimalne stężenia hamujące zawierały się w przedziale 1 - 7 μM (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$). Następnie zbadano aktywność dla trzech związków **7**, **10** i **11** przeciwko szczepom szpitalnym *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*. Ich aktywność przeciwko szczepom Gram-dodatnim była podobna i wynosiła od 7 do 56 μM (2 – 16 $\mu\text{g/ml}$). Tylko związki **10** i **11** były aktywne przeciwko bakteriom Gram-ujemnym w zakresie 7 - 111 μM (2 – 32 $\mu\text{g/ml}$). Warto dodać, że z trzech związków wybranych do oceny aktywności wobec szczepów szpitalnych tylko pochodna **7** wykazała nieznacznie zmniejszoną aktywność w porównaniu do tożsamyh szczepów standardowych. Zwykle poziom wyników w stosunku do standardowych szczepów jest bardzo często trudny do osiągnięcia w stosunku do szczepów szpitalnych. Dlatego należy podkreślić, że dla związków **10** i **11** poziom aktywności pozostał praktycznie niezmienny. Minimalne stężenia hamujące zawierały się w przedziale od 1 do 208 μM (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$) dla szczepów standardowych dla obu pochodnych, następnie 7 - 111 μM (2 – 32 $\mu\text{g/ml}$) dla związku **10** oraz 7 - 54 μM (2 – 16 $\mu\text{g/ml}$) dla związku **11** w przypadku szczepów szpitalnych. Obie pochodne wykazały lepsze wyniki w stosunku do pięciu z ośmiu używanych szczepów szpitalnych *S. aureus* i pięciu z ośmiu używanych szczepów szpitalnych *S. epidermidis* niż referencyjna cyprofloksacyna. W przypadku jednego z ośmiu używanych

szczepów szpitalnych Gram-ujemnych *E. coli ML 16* oba związki były bardziej aktywne niż związek referencyjny.

Główną ideą zaprojektowanej przeze mnie syntezy i koordynowanych badań biologicznych było potwierdzenie tezy, że pochodne tetrazolowe będą bardziej skutecznymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi niż wyjściowe tiomocznikowe substraty. Oczywiście kluczową rolę ma dobór odpowiednich fragmentów terminalnych, w przypadku tej syntezy - ugrupowania heterocyklicznego i pierścienia fenyloвого (bez lub z odpowiednimi podstawnikami). Powszechnie wiadomo, że N-arylotiomoczniki wykazują lepsze właściwości przeciwbakteryjne niż N-alkilotiomoczniki. Rezultaty naszych poprzednich badań wykazały, że preferowanymi N-arylotiomocznikami są ugrupowania: 3-chloro-4-fluorofenylo > 3-bromofenylo > 3,4-dichlorofenylo > 3-fluorofenylo > fenyloetylo > benzylo > 4-chlorofenylo, szeregując je według ich malejącego wpływu. Ponadto podstawniki w obrębie pierścienia fenyloвого powodowały zmiany w zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W większości przypadków jako najbardziej aktywne okazały się pochodne posiadające słabo dezaktywujące podstawniki halogenowe w pozycji *meta*- i/lub *para*- pierścienia. W przypadku większości bakterii Gram-dodatnich, dwupodstawione związki halogenowe były bardziej aktywne niż monopodstawione, ze względu na indukowanie silniejszego efektu elektroujemnego. Tendencję tę zauważono również dla pochodnych 3-bromo- i 3-fluorofenylo. Obecność atomów halogenowych w pozycji *orto*-, a także wprowadzenie podstawników elektrodonorowych w pierścieniu aromatycznym zmniejsza aktywność antybakteryjną¹⁶. Aktywność uzyskanych 1,5-dipodstawionych tetrazoli porównano z korespondującymi tiomocznikami, które były stosowane do syntezy. Tylko jedna pochodna tiomocznikowa, która była użyta do syntezy związku **2** posiadała podobną aktywność względem tożsamej pochodnej tetrazolowej, ale tylko przeciwko szczepom Gram-dodatnim. Pozostałe 1,5-dwupodstawione tetrazole były bardziej aktywne wobec Gram-dodatnich i Gram-ujemnych szczepów bakterii w porównaniu do stosowanych swoich tiomocznikowych substratów. Jedynie związek **12** i jego substrat był nieaktywny. Przyczyną mógł być niepolarny podstawnik w pozycji 1 pierścienia tetrazolu. Z kolei wprowadzenie w tej pozycji pierścienia benzenowego z podstawnikami elektronodonorowymi powodowało wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Jednocześnie stwierdziłem, że wprowadzenie ugrupowania furan-2-ylometanaminowego w pozycji 5 w pierścienia tetrazolowego intensyfikuje działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko szczepom bakterii Gram-ujemnym (związki **10** i **11**).

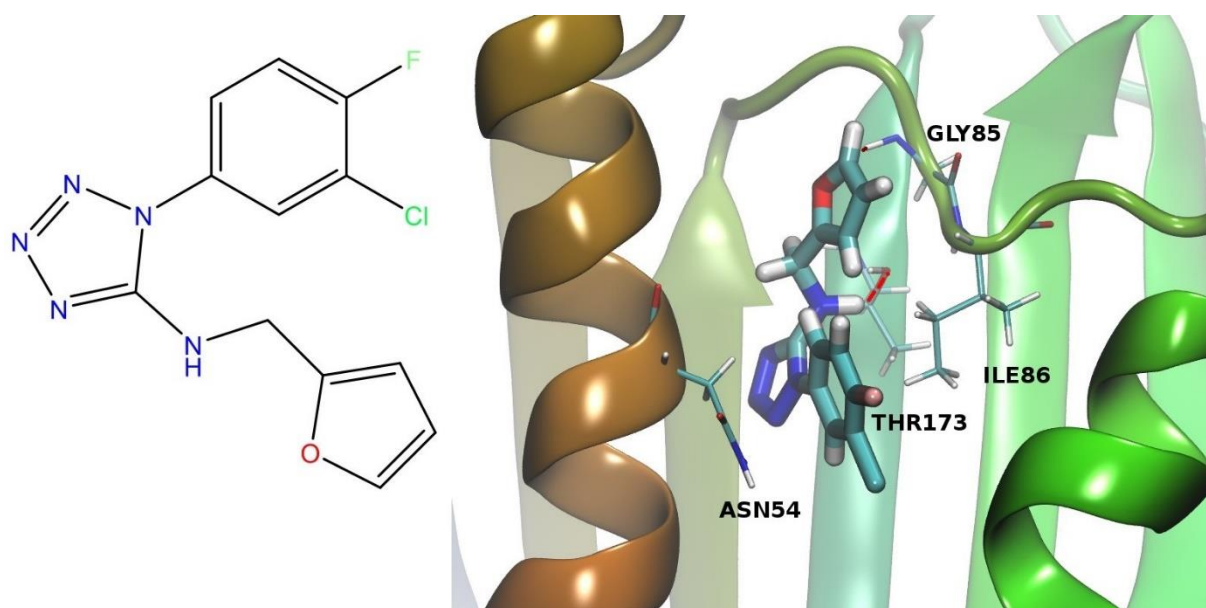
16 Bielenica A, Stefanska J, Stepien K, Napiorkowska A, Augustynowicz-Kopec E, Sanna G, Madeddu S, Boi S, Giliberti G, Wrzosek M, Struga M, Eur J Med Chem. 2015;101:111–125.

Reasumując, reakcja desulfuryzacji/cyklizacji 1,3-dipodstawionych tiomoczników prowadząca do otrzymania 1,5-dipodstawionych tetrazoli wiązała się ze wzrostem aktywności przeciwbakteryjnej. Chcąc poznać genezę bardzo dobrej aktywności zsyntetyzowanych przeze mnie związków, zaplanowałem szereg kolejnych badań.

Dalsze prace badawcze zostały przeprowadzone w kierunku poznania mechanizmu aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Dzięki nawiązanej współpracy z dr hab. Sebastianem Kmiecikiem z Laboratorium Bioinformatyki, Centrum Badań Medycznych Mossakowski oraz dr Michałem Kolińskim z Centrum Badań Biologiczno-Chemicznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego przeprowadzono badanie dokowania molekularnego dla zsyntetyzowanych związków. Zbadano tryb wiązania dla 14 pochodnych oraz cyprofloksacyny do gyrazy DNA i topoizomerazy IV. Wszystkie badane związki preferowały wiązanie się w miejscach wiązania ATP gyrazy i topoizomerazy. Szacowane wolne energie wiązania dla powstałych konformerów wahały się od -3,25 do -7,02 kcal/mol. Związki **7** i **10** tworzyły wiązania wodorowe z katalitycznym Asp81 gyrazy DNA. Ta kluczowa interakcja z resztą Asp była również obserwowana w naszych ostatnich pracach w kompleksach pochodnych tiomocznikowych¹⁷ i była również zgłaszana przez inną grupę badawczą dla serii analogów azaindolowych mocznika¹⁸. Cyprofloksacyna i pochodna **11** wykazały różne sposoby interakcji w miejscu wiązania ATP gyrazy. Żadna z obu cząsteczek nie wchodziła w interakcje z pozostałością Asp81, ale tworzyły dwa wiązania wodorowe z białkiem: cyprofloksacyna z pozostałościami Ile51 oraz Arg144, a pochodna **11** z resztami Gly85 i Thr173 (**Rys. 3.**).

17 Bielenica A, Drzewiecka-Antonik A, Rejmak P, Stefańska J, Koliński M, Kmiecik S, Lesyng B, Włodarczyk M, Pietrzyk P, Struga M. *J Inorg Biochem.* 2018;182:61-70.

18 Zhang J, Yang Q, Cross JB, Romero JAC, Poutsiaka KM, Epie F, Bevan D, Wang B, Zhang Y, Chavan A, Zhang X, Moy T, Daniel A, Nguyen K, Chamberlain B, Carter N, Shotwell J, Silverman J, Metcalf III CA, Ryan D, Lipka B, Dolle RE. *J Med Chem.* 2015;58:8503-8512.



Rys. 3. Pozycja liganda (związek **11**) w miejscu wiązania ATP gyrazy DNA.

Kolejnym przeprowadzonym badaniem, które dostarczyło informacji na temat mechanizmu działania związków były testy inhibicji topoiizomerazy IV oraz gyrazy. Badanie zostało przeprowadzone w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmacji WUM. Wyniki testów wykazały, że 1,5-dipodstawione pochodne tetrazolu były w stanie zahamować aktywność enzymów gyrazy i topoiizomerazy IV bakterii *S. aureus*. Dla badanych związków **10**, **11** istnieje wyraźna korelacja między minimalnym stężeniem hamującym (MIC) a powinowactwem do bakteryjnej topoiizomerazy typu II. Związek **11** był około dwa razy bardziej aktywny wobec badanych szczepów w porównaniu z pochodną **10**. Znalazło to odzwierciedlenie w hamowaniu obu enzymów. Związek **11** okazał się być inhibitorem gyrazy o wyższym potencjale ($IC_{50} 0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) niż referencyjna cyprofloksacyna ($IC_{50} 3,5 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$) w teście hamowania superskręcania (supercoiling assay). Związek **10** wykazywał słabsze działanie w tym teście. Inhibitory gyrazy, zwłaszcza fluorochinolony mają kluczowe znaczenie w terapii przeciwbakteryjnej. Nasze badanie zidentyfikowało związek **11** jako bardzo silnego inhibitora gyrazy, który może posiadać odpowiedni potencjał do bycia substancją czynną leku.

Ostatnie badanie zostało przeprowadzone w celu określenia cytotoksyczności wybranych pochodnych (**2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **10** i **11**), którą mierzono poprzez ocenę żywotności komórek ludzkich nieśmiertelnych keratynocytów z dorosłej ludzkiej skóry (HaCaT) i ludzkiej linii komórek nabłonkowego raka płuca (A549). Eksperyment przeprowadzono w Laboratorium Badań Przedklinicznych WUM. Wybrane do badania związki stosowane w

wysokich stężeniach nieznacznie wpływały na żywotność komórek. Nasze wyniki pokazują, że wszystkie nowe badane tetrazolowe pochodne były mniej toksyczne dla ludzkiej unieśmiertnionej linii komórkowej keratynocytów i bardziej toksyczne dla ludzkiej linii komórkowej nabłonkowego raka płuc. Związek między cytotoksycznością a aktywnością przeciwbakteryjną został również ustalony za pomocą wskaźnika selektywności (SI). Najwyższą wartość SI zaobserwowano dla związku **11** (*M. luteus* i *P. vulgaris* – 84), następnie dla związku **10** z wynikami w zakresie 2.85 – 11.42.

Biorąc pod uwagę rezultaty prac naszego zespołu można stwierdzić, że 1,5-dwupodstawione tetrazole należy uznać za obiecujące substancje przeciwdrobnoustrojowe. Nasze badania wykazały, że związki **10** i **11** posiadają znaczną aktywność przeciwbakteryjną. Dlatego w kolejnych badaniach postanowiłem wrócić do zaprojektowania nowej serii pochodnych bazujących na szkielecie N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazol-5-aminy (**H5**).

Wyniki badań nad przekształcaniem pochodnych tiomocznikowych do tetrazolowych stały się fundamentem do moich dalszych prac w poszukiwaniu nowych bioaktywnych związków. Kolejny projekt badawczy został przeze mnie ukierunkowany na poszukiwaniu aktywności związków tetrazolowych przeciw prątkom gruźlicy (**H3**). Udało mi się potwierdzić wcześniej ich aktywność przeciw wielu szczepom bakterii, ale zabrakło w panelu badawczym prątków *Mycobacterium tuberculosis*.

Gruźlica pozostaje jedną z głównych światowych zagrożeń zdrowotnych pomimo ogólnego spadku częstości zachorowań, ostatnich postępów w zakresie diagnostyki i farmakoterapii. Na skuteczną terapię składa się kilka leków bakteriobójczych podawanych w kombinacji przez kilkanaście miesięcy¹⁹. Leczenie gruźlicy wrażliwej na leki opiera się na zastosowaniu przez co najmniej sześć miesięcy czterech leków: izoniazydu, ryfampicyny, etambutolu i pirazynamidu. Jest to leczenie skuteczne w około 90% przypadków²⁰, choć terapia nie zawsze jest dobrze tolerowana lub prawidłowo dawkowana, co może powodować szereg działań niepożądanych. Jednocześnie rośnie częstość występowania wielolekoopornych przypadków gruźlicy (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) oraz z rozszerzoną opornością (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB). Terapia obu wymaga dłuższego czasu leczenia (do 24 miesięcy) i droższych środków przeciwdrobnoustrojowych o wyższym ryzyku toksyczności, w porównaniu z chorobą podatną na leki. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych cząsteczek o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej. Piśmiennictwo

19 Tiberia S, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Dalcolmo M, D'Ambrosio L, Migliori GB. Pulmonol. 2018;24:86-98.

20 Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017, update World Health Organization, Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

naukowe odnotowuje sukcesy w poszukiwaniu tego typu substancji opartych na strukturze pierścienia tetrazolowego. Nowe pochodne piperazylo-tetrazolu zawierające metaloorganiczne podstawniki pokazały silniejsze działanie względem standardowego szczepu *M. tuberculosis* H₃₇Rv, niż stosowane przeciwgruźlicze leki²¹. Potwierdzono również, że kombinacje N-fenylotetrazolu ze związkami o działaniu przeciwbakteryjnym (chloromycyna, norfloksacyna) lub przeciwgrzybiczym (flukonazol) dają efekty synergistyczne przy stosowaniu niższych dawek i posiadają szersze spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, niż ich odrębna administracja²².

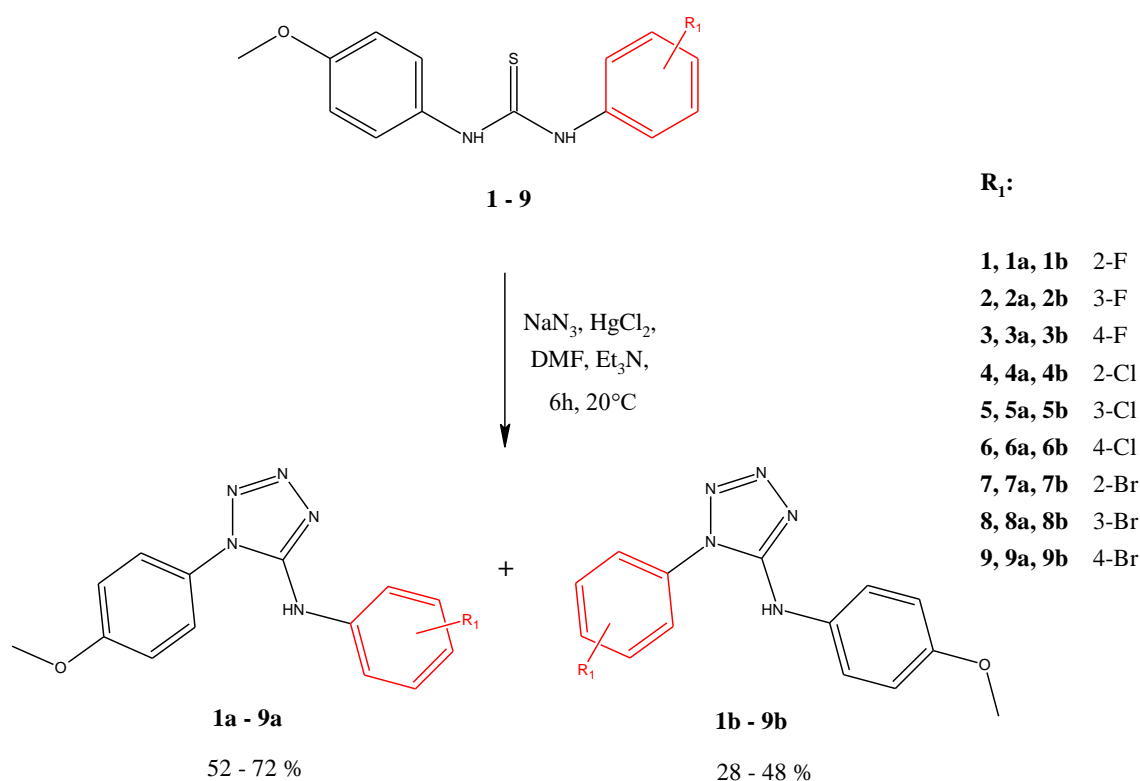
Projektując cząsteczki, które chciałem otrzymać miałem na uwadze to, że obecnie stosowane leki nie posiadają rozbudowanej struktury (izoniazyd, etambutol, pirazynamid) za wyjątkiem antybiotyku ryfampicyny. Fragment tiomocznikowy połączony z giętym podstawnikiem alkiloarylowym jest elementem strukturalnym obecnie stosowanych leków tuberkulostatycznych, jak izoksyl i jego analogi²³. Ponownie uzasadniało to wybór tiomocznikowych pochodnych jako prekursora do otrzymania docelowych związków. Doświadczenie wskazuje na brak wpływu na aktywność podstawnika 4-metoksyfenyloвого, natomiast fragment (*orto*-, *meta*- lub *para*-) halogenofenyloвого był odpowiedzialny za zwiększenie aktywności antybakteryjnej. W zależności od szkieletu centralnego cząsteczki oraz pozycji i rodzaju halogenowca. Biorąc pod uwagę powyższe oraz doświadczenie zespołu badawczego, otrzymałem serię dziewięciu pochodnych 1-(4-metoksyfenylo)tiomoczników. Związki te, służyły mi do ich transformacji do odpowiednich pochodnych 1*H*-tetrazolo-5-aminy. Zsyntetyzowane pochodne tiomocznika tworzyły grupę analogów zwartą strukturalnie, zawierającą terminalny pierścień fenylowy z podstawionym atomem halogenowca w pozycji *orto*-, *meta*- lub *para*-. Utworzenie tożsamy par tiomocznik-tetrazol (substrat-produkt), pozwoliło zbadać wpływ różnych podstawników halogenowych pierścienia fenylowego na ich właściwości przeciwbakteryjne i cytotoksyczność.

Pierwsze próbne reakcje otrzymywania pochodnych tetrazolowych pokazały, że tworzą się jednocześnie dwa izomeryczne produkty reakcji (**Rys. 4**). Podczas monitorowania reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (płytek TLC), a następnie w procesie oczyszczania związków za pomocą chromatografii kolumnowej, udało mi się wyodrębnić produkty tworzące się w przewodzie oraz drugi w mniejszej ilości.

21 Chauhan K, Sharma M, Trivedi P, Chaturvedi V, Chauhan PM. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24:4166-4170.

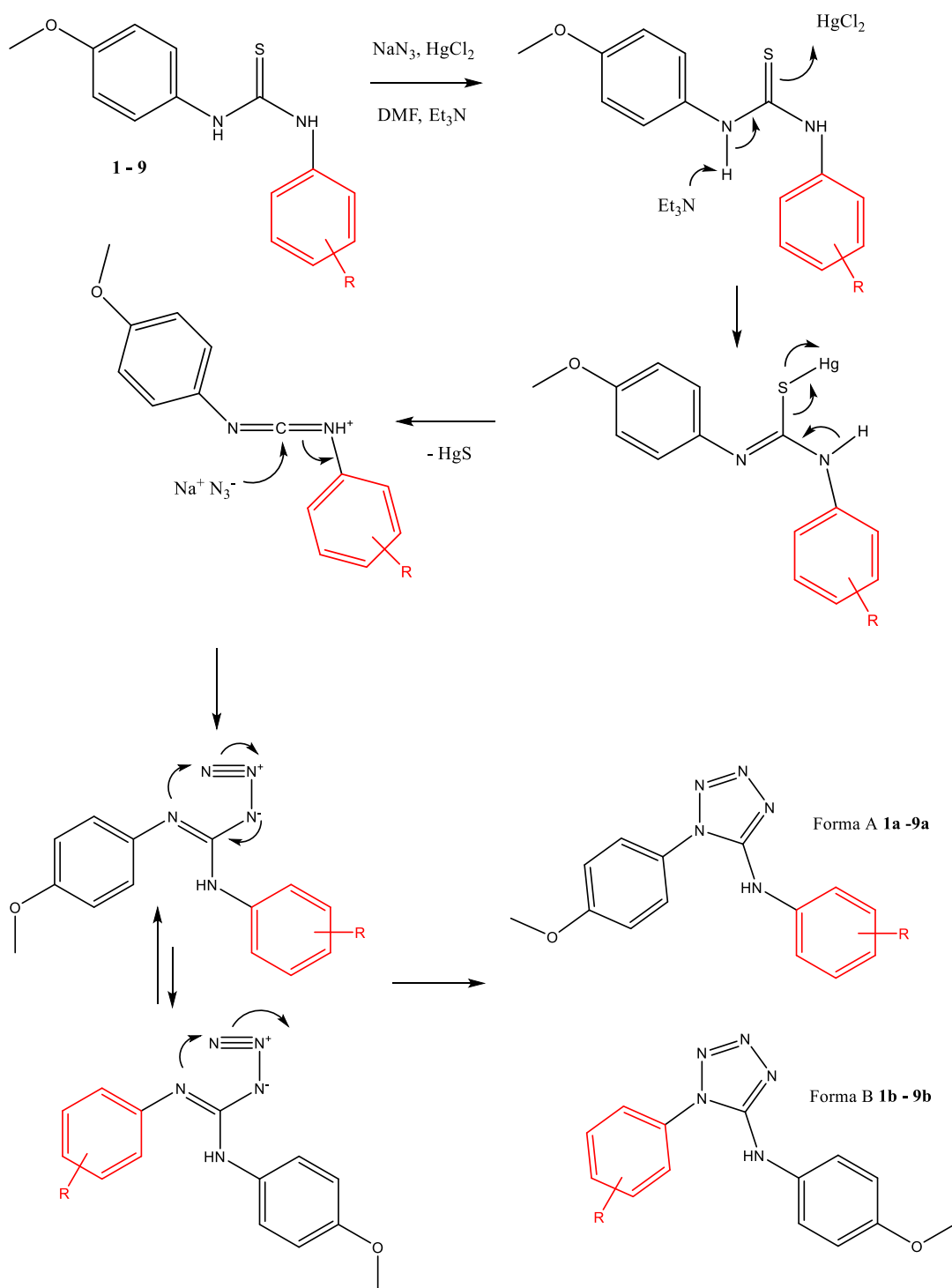
22 Dai LL, Zhang HZ, Nagarajan S, Rasheeda S, Zhou ChH. *Med Chem Commun*. 2015;6:147-154.

23 Phetsuksiri B, Baulard AR, Cooper AM, Minnikin DE, Douglas JD, Besra GS, Brennan PJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(5):1042-1051.



Rys. 4. Synteza regioizomerycznych pochodnych 1,5-tetrazolu.

W ówczesnym czasie nie odnalazłem piśmiennictwa wskazującego na jednoczesne otrzymanie izomerycznych związków opartych na szkielecie tetrazolu, stosując wymienione warunki reakcji. Ilość otrzymanej formy produktu wiązała się bezpośrednio z zawadą przestrzenną powodowaną przez podstawniki. Wraz ze zespołem zaproponowaliśmy tezę, że właściwości fizykochemiczne podstawników mają drugorzędne znaczenie i ich wpływ wymaga indywidualnej oceny. W tym przypadku podstawniki przyłączone do grup NH- tiomocznika były podobne, dlatego desulfuryzacja wraz z cyklizacją mogła przebiec dwukierunkowo z wykorzystaniem jednej z grup iminowych tiomocznikowego substratu. Proponowany mechanizm reakcji to pokazano poniżej (**Rys. 5**).



Rys. 5. Proponowany mechanizm otrzymywania N-(halogenofenylo)-1-(4-metoksyfenylo)-1*H*-tetrazolo-5-amin oraz 1-(halogenofenylo)-N-(4-metoksyfenylo)-1*H*-tetrazolo-5-amin.

Reakcja desulfuryzacji wraz z cyklizacją jest dobrze poznana. Jednak należy podkreślić, że zaprojektowana synteza w kierunku tworzenia się izomerów położenia podstawników względem pierścienia tetrazolowego jest bardzo rzadko opisywana. Założyliśmy, że tworzenie się przeważającej formy A jest związane z występowaniem halogenków przyłączonych do

jednego z pierścieni fenylowych. Atom azotu (NH) tiomocznikowej pochodnej przyłączony do 4-metoksyfenylowego podstawnika należy wskazać jako uprzywilejowany podczas tworzenia się pierścienia tetrazolowego.

Monokryształy 3 związków zostały zbadane techniką krystalografii rentgenowskiej. Było to możliwe dzięki stałej współpracy z dr Michałem Dobrowolskim z Pracowni Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Udało mi się otrzymać kryształy pary regioizomerów (**1a** i **1b**, Rys. 4.) i przekazać do badań. Było to bardzo istotne, ponieważ ostatecznie potwierdziło tworzenie się regioizomerów podczas syntezy związków. Stanowiło dla mnie również cenne uzupełnienie podczas interpretacji wyników przeprowadzonych badań spektroskopowych. Warto podkreślić, że oprócz tradycyjnego opisu struktur geometrie molekularne dla pochodnych **1a** i **1b** zostały zoptymalizowane (poziom teorii HF/3-21G*) z wykorzystaniem programu Gaussian 03. Obliczenia na poziomie teoretycznym wykazały, że geometria związku **1a** ma mniejszą energię niż **1b** o 14,4 kcal/mol. Wynik ten wskazuje, że formy **A** syntetyzowanych związków z wyższymi wydajnościami należy uznać za bardziej stabilne.

Główne badania przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie oraz w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszystkie zsyntetyzowane związki przebadano *in vitro* pod kątem siły działania przeciwgruźliczego przeciwko szczepom *M. tuberculosis* H₃₇Rv i trzem „typu dzikiego” wyizolowanym od pacjentów z gruźlicą: lekoopornemu szczepowi Spec. 210 (z opornością na kwas p-aminosalicylowy PAS, izoniazyd INH, etambutol EMB i ryfampicyna RMP), szczepowi Spec. 192, w pełni podatnemu na tuberkulostatyki i monoopornemu na izoniazyd szczepowi Spec. 800. Badania objęły również grupę szczepów niegruźliczych (*M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare*). Aktywności przeciwko mykobakteriom wyrażono jako minimalne stężenia hamujące (MIC), z lekami pierwszego rzutu jako substancjami referencyjnymi (izoniazyd INH, ryfampicyna RMP, streptomycyna SM i etambutol EMB). Wstępne badania aktywności przeciwbakteryjnej pochodnych 1-(halogenofenyl)-3-(4-metoksyfenyl)tiomoczników pokazały, że ich aktywność tuberkulostatyczna jest na poziomie od umiarkowanej do słabej. Choć żadna pochodna tiomocznikowa nie zbliżyła się do poziomu aktywności referentów, to pochodne 2-chloro- (**4**) i 4-bromo- (**9**) fenylotiomocznikowe najbardziej hamowały wzrost szczepu *M. tuberculosis* 192, z wartościami MIC równymi 25 µg/ml. Związki **4**, **6-8** wykazywały ten sam poziom aktywności wobec izolatu 210 jak wzorce: RMP i EMB. Zauważono, że obecność bromu w dowolnej pozycji pierścienia fenylowego (pochodne **7-9**) lub zastąpienie pozycji *orto*-

i *para*- chlorem (**4**, **6**), promowały przeciwgruźlicze działanie badanej fenylotiomocznikowej pochodnej.

Racjonalnie zaprojektowane struktury związków tetrazolowych **1a-9a** i **1b-9b** pozwoliły zbadać jak rodzaj izomerii podstawnikowej wpłynął na właściwości biologiczne, zwłaszcza przeciwbakteryjne. Okazało się, że wielolekooporny szczep *M. tuberculosis* 210 był najbardziej podatny na działanie zsyntetyzowanych regioizomerów tetrazolu.

Związek	LogP**	R	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	<i>M. tuberculosis</i> Spec. 192 wrażliwy na tuberkulostatyki	<i>M. tuberculosis</i> Spec 210 wielolekooporny	<i>M. tuberculosis</i> Spec. 800*
1a	2.75	2-F-Ph	16	16	16	ND
2a	2.71	3-F-Ph	8	8	8	256
3a	2.71	4-F-Ph	32	32	32	512
4a	2.97	2-Cl-Ph	8	8	8	256
5a	2.93	3-Cl-Ph	32	32	32	256
6a	2.95	4-Cl-Ph	16	16	16	256
7a	3.05	2-Br-Ph	64	64	64	512
8a	3.02	3-Br-Ph	2	2	2	128
9a	3.04	4-Br-Ph	2	2	2	128
1b	2.69	2-F-Ph	16	16	16	ND
2b	2.86	3-F-Ph	16	16	16	256
3b	2.71	4-F-Ph	8	8	8	128
4b	2.94	2-Cl-Ph	8	8	8	128
5b	2.97	3-Cl-Ph	8	8	8	128
6b	2.96	4-Cl-Ph	8	8	8	128
7b	3.01	2-Br-Ph	16	16	16	256
8b	3.07	3-Br-Ph	16	16	16	256
9b	3.05	4-Br-Ph	16	16	16	256
Izoniazid			0.125	0.125	16	2
Ryfampicyna			1	1	32	1
Streptomycyna			1	1	16	1
Etambutol			2	2	32	2

* INH-monolekooporny w wyniku mutacji w regionie promotorowym *InhA*, ND – nie oznaczono

**logP wartości oznaczone za pomocą oprogramowania: <http://www.swissadme.ch>

Tabela 2. Aktywność otrzymanych regioizomerów wobec wybranych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wyrażona w minimalnych stężeniach hamujących (MIC, µg/ml).

Wszystkie związki za wyjątkiem pochodnej **7a**, były równie lub bardziej skuteczne wobec szczepu niż referencyjne farmaceutyki (**Tabela 2**). N-(bromofenylo)-tetrazolo-5-aminy (**8a**, **9a**), o wartościach MIC 2 µg/ml, były do 16-krotnie silniejsze w działaniu niż referencyjne RMP i EMB oraz 8 razy bardziej aktywne w porównaniu do INH i SM. Należy podkreślić, że wyniki badań przeprowadzonych przez nasz zespół pokazują wysoki potencjał pochodnych tetrazolowych. Aktywność przeciwgruźlicza otrzymanych regioizomerów była więcej niż obiecująca. Biorąc pod uwagę zależność struktura-aktywność, zauważono, że siła działania na szczepy standardowe i „typu-dzikiego” zależy od:

- 1) rodzaju badanego izomeru położenia (pochodne N-halogenofenyłu bardziej skuteczne niż 1-halogenofenyłowe)
- 2) charakteru halogenku w pierścieniu fenyłowym (bioaktywność spada odpowiednio: bromo» chloro» fluoro)
- 3) miejsca podstawnika (*meta*- i *para*- izomery były bardziej skuteczne niż *orto*-).

Podobną tendencję zaobserwowaliśmy dla szczepów nie gruźliczych. Szczep *M. Scrofulaceum* był najbardziej wrażliwy na ekspozycję na badane tetrazole. Pochodna 1- (3-chlorofenylo)-1*H*-tetrazolo-5-aminy (**5b**) odznaczyła się najwyższą skutecznością (MIC = 2 µg / ml) i była 32-krotnie bardziej aktywna niż referencyjny INH. Podsumowując, 1-halogenofenyłopodstawione izomery były najbardziej efektywne w stosunku do szczepów bakterii nie gruźliczych. Ustalono, że preferowanym podstawieniem pierścienia fenyłowego było fluoro lub chloro w pozycji *meta*- i *para*-, mniej *orto*-. Wprowadzenie do struktury badanych związków bromu i podstawienie pierwszorzędowej grupy aminowej fragmentem halogenofenyłowym (N-halogenofenyłopodstawione pochodne) spowodowało zmniejszenie bioaktywności wobec badanych bakterii.

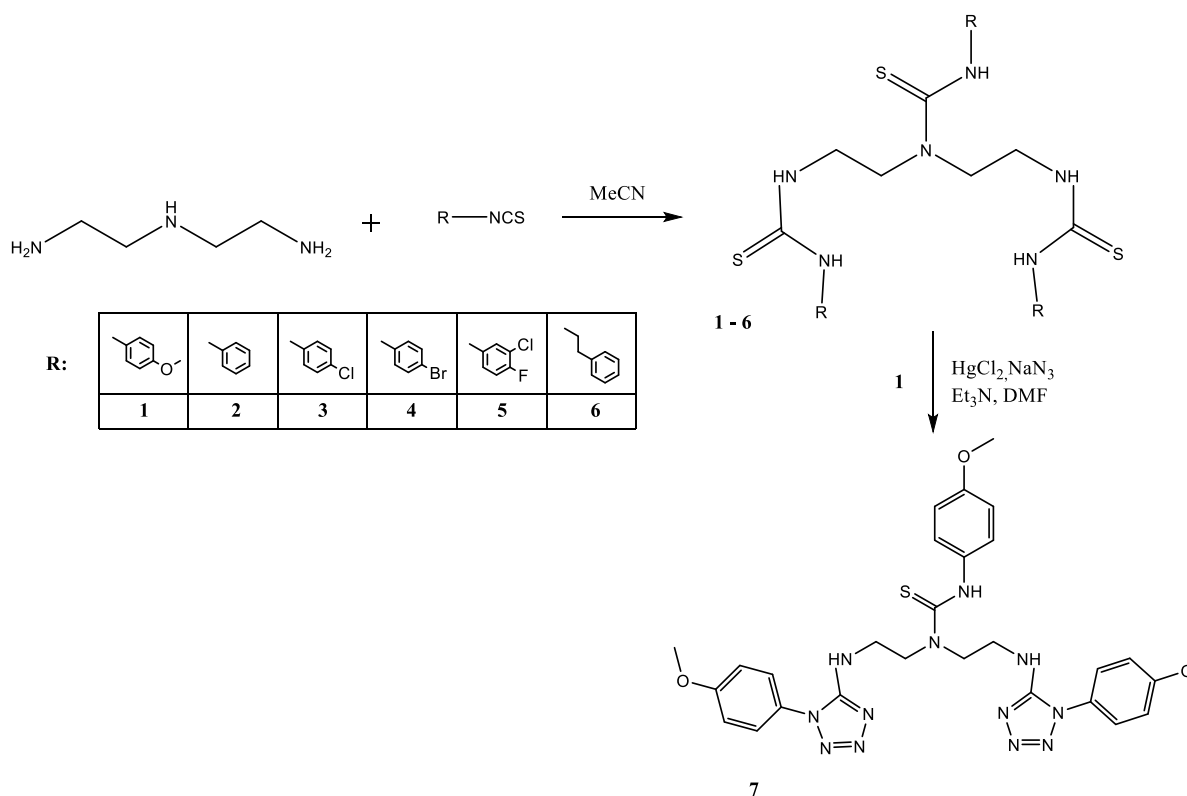
Dodatkowo zbadano efekt synergistyczno-antagonistyczny działania kombinacji dwóch najbardziej aktywnych związków z poszczególnymi substancjami referencyjnymi. Wykazano synergistyczny efekt kombinacji **9a**/SM na trzy szczepy *M. tuberculosis*, a także addytywność działania zarówno dla związku **8a**, jak i **9a** w parze z: INH, RMP lub EMB. Wykazano antagonizm kombinacji tetrazol-INH w stosunku do obu lekowrażliwych izolatów (*M. tuberculosis* H₃₇Rv i Spec. 192) oraz wysoką oporność dla Spec. 800 wobec połączeń związków.

Selektywność wobec prątków gruźlicy potwierdziło oznaczenie aktywności przeciw pięciu szczepom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym (łącznie 10 szczepów). Żaden z 4-metoksyfenylotiomoczników (**1-9**) nie wykazywał działania przeciwbakteryjnego. Jedynie niektóre regioizomery tetrazolu (**2a-4a**, **6a**, **1b**, **3b**, **4b**) posiadały niewielką siłę hamowania wzrostu bakterii *S. epidermidis* i *S. aureus*, z wartościami MIC w zakresie od 32 do 64 µM. Kolejne rezultaty przeprowadzonych przez zespół badań *in vitro* wykluczyły możliwość aktywności przeciwdrobnoustrojowej opartej o cytotoksyczność. Wykazano bowiem, iż zsyntetyzowane tetrazole mają znikomy wpływ na dwie prawidłowe i trzy linie komórek nowotworowych przy stężeniu 100 µM, nie hamując zauważalnie wzrostu bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych.

Podsumowując, otrzymana przeze mnie grupa regioizomerów tetrazolu odznacza się znaną bioaktywnością. Wysoki poziom aktywności przeciwgruźliczej został oznaczony dla obu grup tetrazoli (regioizomerów). Związki nie są cytotoksyczne. Należy zauważyć, że w badaniach brały udział również tiomocznikowe substraty, dla których wykazano słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Transformacja substratów tiomocznikowych za pomocą reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją pozwoliło otrzymać wysoce bioaktywne związki oparte na centralnym pierścieniu tetrazolowym. Co więcej, występująca dla tej grupy pochodnych izomeria położenia podstawników stanowi ciekawy obiekt do badań zależności struktura-aktywność. Badania SAR (structure-activity relationship) wymagają poszerzenia grupy badanych związków w celu wyciągnięcia jednoznacznych wniosków.

Podczas prac badawczych nad pochodnymi tetrazolowymi optymalnym było stosowanie 1,3-dipodstawionych tiomoczników jako substratów, ze względu na wieloletnie doświadczenie własne oraz Zespołu w pracy nad tymi związkami. Postanowiłem więc sprawdzić możliwość stosowania metody syntetycznej otrzymywania 1.5-dipodstawionych tetrazoli dla pochodnych tiomocznikowych o bardziej rozbudowanej strukturze (**H4**). Równie istotne było sprawdzenie właściwości biologicznych otrzymanych pochodnych tiomocznikowych, a przede wszystkim ich cytotoksyczności.

Dobór właściwej aminy, będącej substratem do otrzymania pochodnych tiomocznikowych był kluczowy. Zdecydowałem się na bis(2-aminoetylo)aminę ze względu na możliwość otrzymania relatywnie dużych pochodnych o masach molowych od 508.73 do 745.41g/mol. Jednocześnie, amina ta rzadko jest stosowana pod kątem użyteczności w badaniach nad nowymi farmaceutykami. Pod względem syntetycznym, posiada dwie grupy aminowe oraz jedną iminową, stąd zaprojektowane przeze mnie pochodne zawierają trzy fragmenty tiomocznika (**Rys. 6.**). W związku z brakiem informacji o właściwościach biologicznych tego typu pochodnych, zdecydowałem się otrzymać grupę sześciu pochodnych tiomocznikowych. Następnie, w wyniku przeprowadzonej reakcji desulfuryzacji oraz cyklizacji, otrzymałem związek tetrazolowy **7**, potwierdzając możliwość zastosowania wybranej przeze mnie metodyki syntetycznej. Należy podkreślić, że wydajności wszystkich reakcji były bardzo dobre. Reakcjom nie towarzyszyły produkty uboczne.



Rys. 6. Szlak syntetyczny dla otrzymanych sześciu pochodnych tiomocznikowych oraz jednej tetrazolowej.

Konsekwencją wyboru aminy było pogwałcenie „reguły pięciu” Lipińskiego²⁴ przez wszystkie otrzymane związki. Wyznaczony przeze mnie współczynnik podziału oktanol-woda (LogP) zawierał się w przedziale 2.17 - 5.64. Należy uznać je za posiadające zróżnicowaną lipofilowość. Cztery pochodne **3**, **4**, **5**, **7** naruszyły dwie zasady Lipińskiego. Pochodną **7** zsyntetyzowano stosując **1** jako materiał wyjściowy z dwóch głównych powodów. Po pierwsze, przejście z układu tiomocznika do tetrazolu praktycznie nie zmieniało masy molowej, ale miało wpływ na lipofilowość. Po drugie, nasze poprzednie badania pokazały, że ta zmiana strukturalna jest korzystna pod względem działania farmakologicznego (**H2**, **H3**). Postanowiłem zsyntetyzować tylko jedną pochodną tetrazolową w pierwszym etapie badań, w celu porównania wyników cytotoksyczności otrzymanych pochodnych tiomocznika i tetrazolu. Wybór tiomocznikowej pochodnej **1** jako substratu nie był przypadkowy. Z poprzednich badań wiedziałem, że podstawnik 4-metoksyfenylowy zwykle nie odpowiada za aktywność biologiczną, zarówno tiomocznikowych oraz tetrazolowych pochodnych. Aczkolwiek, są niezwykle przydatne do badań strukturalnych, ponieważ łatwiej niż w przypadku pozostałych pochodnych można otrzymać kryształy dobrej jakości. Udało mi się dzięki temu po raz kolejny

24 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Adv Drug Deliv Rev. 1997;23:3–25.

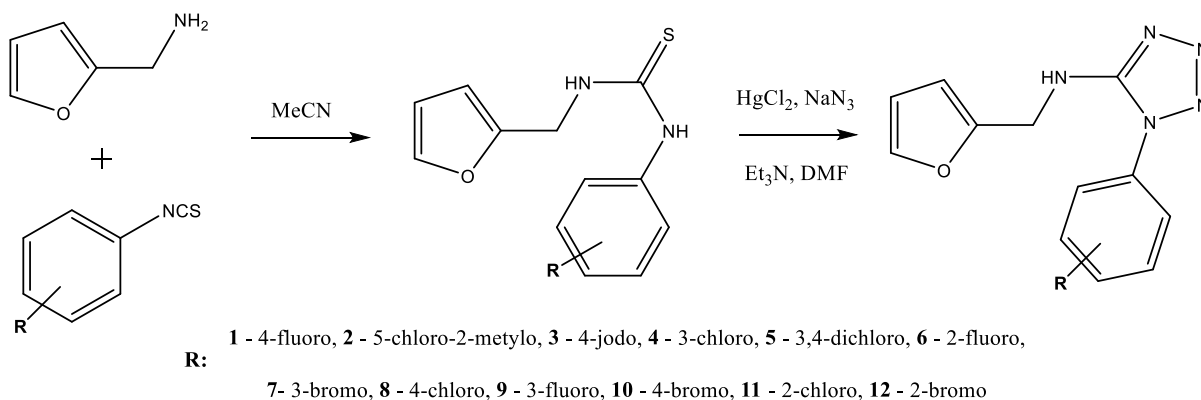
otrzywać monokryształy pary substrat (tiomocznik)-produkt (tetrazol). Zostały zbadane w Pracowni Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W rezultacie udało się określić różnice strukturalne, sposób upakowania w kryształy oraz wybrane oddziaływania. Cytotoksyczność jest jednym z najważniejszych wskaźników oceny biologicznej badań *in vitro*. Substancje chemiczne, takie jak leki, mają różne mechanizmy cytotoksyczności, takie jak niszczenie błon komórkowych, zapobieganie syntezie białek, nieodwracalne wiązanie z receptorami itp. Aby określić sposób śmierci komórki spowodowaną tymi uszkodzeniami, istnieje potrzeba wiarygodnych i powtarzalnych szybkich testów cytotoksyczności i żywotności komórek. Oba testy są oparte na różnych funkcjach komórek. Obecnie w toksykologii i farmakologii stosuje się szerokie spektrum testów cytotoksyczności²⁵. Testy te są powszechnie stosowane jako testy przesiewowe dla związków ukierunkowanych na komórki nowotworowe. Podstawową ideą jest obserwacja wzrostu, rozmnażania i efektów morfologicznych normalnych i zmutowanych komórek. Cytotoksyczność jest preferowana jako test pierwszego wyboru i ważny wskaźnik oceny toksyczności. Dlatego zdecydowałem się zaprojektować odpowiednie badania dla nowej grupy związków, które zostały wykonane w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszystkie pochodne bis(2-aminoetylo)aminy zostały przebadane pod kątem ich cytotoksycznego działania *in vitro* na zestaw ludzkich linii komórkowych raka, mianowicie gruczolakoraka jelita grubego (CaCo-2), gruczolakoraka płuc (A549) i czerniaka (HTB-140) oraz wobec prawidłowych keratynocytów (HaCaT), stosując metodę MTT. Testowane związki wykazywały umiarkowaną siłę przeciwproliferacyjną. Najwyższą aktywność hamującą wzrost na wszystkich liniach komórek nowotworowych stwierdzono dla pochodnej fenetylowej **6**. Wykonano kolejne eksperymenty: test dehydrogenazy mleczanowej (LDH), badanie apoptozy, oraz badanie wpływu związków na uwalnianie i poziom Interleukiny-6 (IL-6). W wyniku przeprowadzonych badań biologicznych stwierdzono, że wydzielanie LDH z komórek HTB-140 wahało się od 25,5% do 30,8%, a związek **6** wykazał najwyższą odpowiedź. Ogólnie rzecz biorąc, pochodna fenetylowa **6** była najbardziej aktywna, wpływając na apoptozę komórek A549, ale także w znacznym stopniu (w 55,7%) indukując wczesną apoptozę w liniach komórkowych CaCo-2. Jednak, najsilniejszy wpływ w komórkach A549 oznaczono dla związku 4-bromofenetylowego **4**, który hamował uwalnianie interleukiny prawie dziesięciokrotnie bardziej w porównaniu z wzorcem. Najbardziej cytotoksyczne pochodne tiomocznikowe (**3–6**) charakteryzują się najwyższą wartością współczynnika

25 Aslantürk ÖS. IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 1–18.

podziału oktanol-woda (3,51–4,83). Jednak w przeciwieństwie do innych aktywnych pochodnych, najbardziej obiecujący związek **6**, z logP 3,51, był zgodny z regułą Lipińskiego. Pochodne **1**, **2** i **7** posiadające współczynniki podziału od 2,17 do 3,47, można określić jako nieaktywne biologicznie. Silna zależność między aktywnością cytotoksyczną, a obecnością podstawników elektroujemnych na pierścieniu fenylovym pochodnych tiomocznikowych została wcześniej udowodniona przez nasz Zespół. Tak jak przewidywano, otrzymana pochodna tetrazolowa była nieaktywna wobec komórek nowotworowych i prawidłowych. Pod kątem dalszych badań jest to dobry rezultat, ponieważ cytotoksyczność wobec prawidłowych komórek dyskwalifikowała by dalsze badania nad tą grupą związków.

Podsumowując, pochodne bis(2-aminoetylo)aminy należy uznać za obiecujące. Rezultaty badań pochodnych tiomocznikowych oraz charakterystyka pochodnej tetrazolowej pokazują, że istnieje potrzeba pogłębienia badań. Przyszłe prace będą prowadzone na szerszej grupie pochodnych, w szczególności tetrazolowych, aby móc w sposób rzetelny przeprowadzić badania zależności struktura-aktywność (SAR) dla tej mało poznanej grupy związków.

Pierwsza kontynuacja badań, dotycząca wcześniej otrzymanych i scharakteryzowanych związków tetrazolowych (**H2**), została przedstawiona w publikacji opisującej właściwości biologiczne pochodnych N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-aminy (**H5**). W ówczesnej pracy (**H2**) najlepsze wyniki znaleziono dla dwóch związków posiadających jako jeden z fragmentów terminalnych pierścien furanowy. Zdecydowałem się przygotować nową serię związków zawierających to ugrupowanie i ocenić je pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zaprojektowałem 12 nowych pochodnych N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-aminy (**Rys. 7**). Związki te posiadały różne podstawniki halogenofenylove. Obecność halogenków miało za zadanie powodować wyciąganie z pierścienia fenylovego elektronów, zmieniając ich gęstość w obrębie fragmentu terminalnego.



Rys. 7. Otrzymywanie pochodnych N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-aminy.

Po zaprojektowaniu związków, przeprowadziłem badania *in silico* potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej oraz predykcję parametrów toksykologicznych. Korzystając z oprogramowania „AntiBac-Pred”²⁶ określiłem wysokie prawdopodobieństwo aktywności wobec szczepu *Mycobacterium tuberculosis* dla całej zaprojektowanej serii związków. Dla pochodnych **7**, **10** oraz **12** otrzymałem wysoki wynik potencjalnej aktywności wobec szczepu lekoopornego *Staphylococcus aureus subsp. aureus* MW2. Parametry toksykologiczne wyznaczyłem za pomocą oprogramowania pkCSM²⁷. Żaden ze związków nie posiadał pozytywnego wyniku w teście AMES’a, co wskazuje na brak efektu karcynogenego. Wyniki wyznaczonych parametrów były jednolite dla całej serii związków.

Zaprojektowane związki tetrazolowe otrzymałem podobnie jak w poprzednich projektach dzięki zastosowaniu reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją. Użyłem odpowiednich pochodnych tiomocznikowych jako substratów. Otrzymałem produkty z bardzo dobrymi wydajnościami. Struktury zostały potwierdzone przeze mnie za pomocą widm spektroskopowych. Dodatkowo, dzięki stałej współpracy z dr Michałem Dobrowolskim z Pracowni Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego otrzymano wizualizację struktur molekularnych pochodnej tetrazolowej **8** i jego substratu **8a**. W rezultacie udało się określić różnice strukturalne, sposób upakowania w kryształach oraz wybrane oddziaływania pomiędzy przedstawicielem grupy produktów oraz substratów.

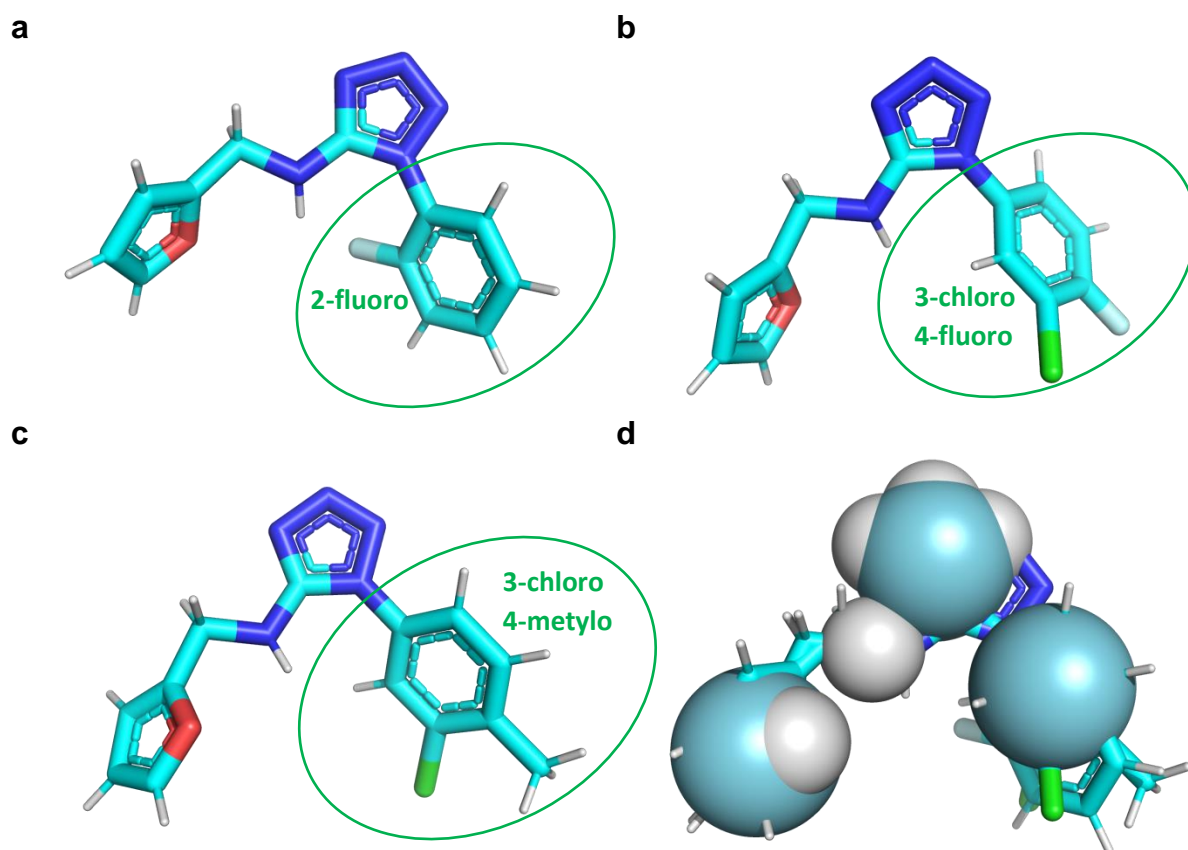
Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostało przeprowadzone w ramach współpracy z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Wszystkie zsyntetyzowane związki zostały przebadane *in vitro* w kierunku aktywności wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. W związku z tym, że prowadzony przeze mnie projekt badawczy stanowił kontynuację wcześniejszych badań, zastosowano metodyka badawczą analogiczną do badanych wcześniej pochodnych tetrazolowych (**H2**). Należy w tym miejscu przypomnieć, że najaktywniejszymi w ówczesnej pracy badawczej były 1-(3-chloro-4-metylofenylo)-N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-amina oraz 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-amina. Prawie cała grupa otrzymanych pochodnych charakteryzowała się umiarkowaną lub słabą aktywnością przeciwbakteryjną. Spośród otrzymanych dwunastu pochodnych N-(furan-2-ylometylo)-1*H*-tetrazolo-5-aminy związek **6** wykazywał największą aktywność wobec panelu standardowych i klinicznych

26 Pogodin PV, Lagunin AA, Rudik AV, Druzhilovskiy DS, Filimonov DA, Poroikov VV. AntiBac-Pred: A Web Application for Predicting Antibacterial Activity of Chemical Compounds. *J Chem Inf Model.* 2019 Nov 25;59(11):4513-4518.

27 Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem.* 2015 May 14;58(9):4066-72.

szczepów bakterii. W przypadku wybranych izolatów klinicznych rezultaty były lepsze niż dla referencyjnej cyprofloksacyny. Warto zaznaczyć, że ta pochodna działała hamująco od 8 do 16 razy silniej na dwa kliniczne szczepy *S. epidermidis* niż wzorzec. Ponadto, był w połowie tak silny jak cyprofloksacyna przeciwko izolatowi gronkowca KR 4047 825/19.

Wyniki kolejnych badań potwierdziły, że żadna z badanych pochodnych nie była cytotoksyczna wobec prawidłowych komórek HaCaT. Żaden z syntetyzowanych związków nie został rozpoznany jako kandydat do dodatkowych testów w kierunku aktywności przeciwgruźliczej.



Rys 8. Najbardziej aktywne przeciw drobnoustrojom zsyntetyzowane pochodne tetrazolowe oraz zaproponowany model farmakoforowy oddziaływania z bakteryjną gyrazą DNA.

Model farmakoforowy został zaproponowany dzięki współpracy z dr hab. Sebastianem Kmiecikiem z Centrum Badań Biologiczno-Chemicznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (**Rys. 8.**). Zidentyfikowano osiem jednostek farmakoforowych - trzy aromatyczne, trzy akceptory w pierścieniu tetrazolowym oraz dwa donory, tlen w pierścieniu furanowym i azot grupy aminowej. Podstawników fenyłowych nie uznano za jednostki farmakoforowe.

Podsumowując, nowe pochodne N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-amin mogą być brane pod uwagę jako potencjalne substancje aktywne o działaniu przeciwbakteryjnym. Dzięki kontynuacji rozpoczętego wcześniej projektu badawczego, został wyłoniony związek **6** o podstawniku 2-fluorofenylo, który posiadał podobny poziom bioaktywności, co wcześniejsze dwie najaktywniejsze pochodne N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-aminy.

Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac (wnioski):

- Zaprojektowanie i otrzymanie serii pochodnych tiosemikarbazydu opartej o trzy pierścienie heterocykliczne (1,2,4-triazolu, 1,3,4-tiadiazolu i 1,3,4-oksadiazolu) wraz z określeniem aktywności biologicznej.
- Zaplanowanie i synteza związków tiomocznikowych oraz przekształcenie ich do pochodnych tetrazolowych za pomocą reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją. Zbadanie możliwości zastosowania metody syntetycznej dla substratów charakteryzującą się strukturalną różnorodnością.
- Ustalenie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego heterocyklicznych pochodnych 1,5-tetrazolu (inhibitowanie topoizomerazy IV oraz gyrazy DNA), a także zaproponowanie modelu wiązania tych związków do obu topoizomera. Dwie najbardziej aktywne pochodne N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-aminy wykazały lepsze wyniki w stosunku do pięciu z ośmiu użytych szczepów szpitalnych *S. aureus* i pięciu z ośmiu użytych szczepów szpitalnych *S. epidermidis* niż referencyjna cyprofloksacyna.
- Przeprowadzenie kontynuacji prac syntetycznych oraz badań dla pochodnych N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-aminy, wyłonienie kolejnej pochodnej o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zaproponowanie modelu farmakoforowego oddziaływania z bakteryjną gyrazą DNA na podstawie struktur molekularnych związków o największej bioaktywności.
- Otrzymanie regioizomerów 1H-tetrazolo-5-aminy o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej. Wszystkie związki (za wyjątkiem jednej pochodnej) były równie lub bardziej skuteczne wobec wielolekoopornego szczepu *M. tuberculosis* 210 niż referencyjne farmaceutyki. N-(bromofenylo)-tetrazolo-5-aminy o wartościach MIC 2 µg/ml, były do 16-krotnie silniejsze w działaniu niż referencyjne ryfampicyna i etambutol oraz 8 razy bardziej aktywne w porównaniu do izoniazydu i streptomycyny. Dodatkowo określono efekt synergistyczno-antagonistyczny działania kombinacji

dwóch najbardziej aktywnych związków z poszczególnymi substancjami referencyjnymi, potwierdzając działanie synergistyczne oraz addytywne.

- Synteza serii tiomocznikowych pochodnych bis(2-aminoetylo)aminy oraz określenie ich cytotoksyczności do dalszych badań. Potwierdzenie możliwości zastosowania reakcji cyklizacji połączonej z cyklizacją dla otrzymanej nowej grupy substratów.
- Koordynacja badań krystalograficznych mających na celu wskazanie różnic strukturalnych między pochodnymi tiomocznikowymi (substrat) a tetrazolowymi (produkt) oraz pomiędzy otrzymanymi formami izomerycznymi (regioizomerami) związków tetrazolowych.

Prowadzone przeze mnie badania są wielotorowe, ponieważ angażują kompetencje zespołów badawczych wielu dziedzin pokrewnych. Wspólnym mianownikiem prac jest przeprowadzenie analizy zmian struktura-aktywność dla cyklicznych związków (głównie tetrazoli), otrzymanych z pochodnych tiomocznikowych w wyniku zastosowania reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją. Bycie koordynatorem badań pozwoliło mi na odnalezienie związków o podobnym poziomie bioaktywności do substancji referencyjnych. Spektrum aktywności biologicznych pochodnych tetrazolu pokazuje konieczność poszukiwań substancji leczniczych w obrębie tej grupy związków.

Wyniki prowadzonych przeze mnie badań są przedmiotem poniższych zgłoszeń patentowych:

- Zgłoszenie wynalazku w Urzędzie Patentowym RP „Nowe pochodne 5-aminotetrazolu o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym”, Numer zgłoszenia: P. 422741
- Zgłoszenie międzynarodowe PCT wynalazku „New 5-aminotetrazole derivatives with antibacterial and antifungal activity” Numer zgłoszenia: PCT/PL2018/050047

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a) Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Początek mojej pracy naukowej miał miejsce na IV roku studiów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W Pracowni Chemii Związków Naturalnych pod kierownictwem Prof. dr hab. Zbigniewa Czarnockiego prowadziłem badania wchodzące w skład mojej pracy magisterskiej. Zastosowanie modyfikowanych borowodorków w stereoselektywnej redukcji 1-metylo-2-aryloetylideno-1-fenyletyloamin było przedmiotem moich prac.

Założone cele pracy zostały przeze mnie zrealizowane. Udało mi się przeprowadzić syntezę [2-(3,4-dimetoksyfenilo)-1-metyloetylo]-(1-feniloetylo)aminy i [2-(2-metoksyfenilo)-1-metyloetylo]-(1-feniloetylo)aminy w celu wyłonienia najlepszego stereoselektywnego odczynnika redukującego, którym okazał się być borowoderek sodu modyfikowany kwasem piwalinowym. Następnie wykonałem dwanaście syntez potwierdzających skuteczność stereoselektywnego odczynnika redukującego dla dimerycznych amin, będących związkami modelowymi dla syntezy amfetaminy, metamfetaminy oraz ich pochodnych. Określiłem stosunek diastereoizomerów dla każdej z zsyntetyzowanej przeze mnie aminy za pomocą analizy GC-MS. Określiłem, iż powstającym w przewodzie jest diastereoizomer *trans*. Ze względu na charakter pracy, część rezultatów może być pomocna przy profilowaniu zanieczyszczeń narkotyków.

W październiku 2008 roku podjąłem pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej WUM, kierowanej przez Prof. dr hab. Jerzego Kossakowskiego. Wiodącym kierunkiem badawczym w Katedrze było poszukiwanie nowych substancji o potencjalnym oddziaływaniu na ośrodkowy układ nerwowy w grupie N-podstawionych pochodnych imidów cyklicznych. Część pracy badawczej skupiła się na grupie arylopiperazynylowych pochodnych imidów, których modyfikacja strukturalna pozwoliłaby na otrzymanie związków o działaniu ukierunkowanym na układ nerwowy. Zdobywając doświadczenie, prowadziłem zarówno projekty autorskie tematycznie oraz angażowałem się w projekty współpracowników. Zaangażowałem się w modyfikacje syntetyczne związków heterocyklicznych, szczególnie policyklicznych imidów (**O4**), ale również benzofuranów (**O1**) i benzotiazoli (**O3**). Rozpocząłem pierwsze badania wstępne związane z tematyką pracy doktorskiej (**O2**).

Główne prace syntetyczne koncentrowały się wokół otrzymywania pochodnych tiomocznikowych o wielokierunkowej aktywności biologicznej. Promotorem pracy doktorskiej była Prof. dr hab. Marta Struga. Uzyskałem wsparcie finansowe badań do pracy doktorskiej, otrzymując grant „Młody Naukowiec” nr. 1M8/PM11/11 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W efekcie prac otrzymałem 78 pochodnych tiomocznikowych 2-aminotiazolu, 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol oraz tryptaminy, z czego 55 nie zostało wcześniej opisanych w piśmiennictwie. Przekazałem 58 związków do badań w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Jednocześnie, koordynowałem analizę strukturalną otrzymanych produktów, ocenę cytotoksyczności, badania w kierunku aktywności przeciwwirusowej oraz ocenę wpływu pochodnych tiomocznikowych na ośrodkowy układ nerwowy. Najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową charakteryzowały się pochodne z układem

heterocyklicznym tiazolu, najmniej aktywne zaś były pochodne tryptaminy. Badane pochodne, oprócz jednej, wykazywały cytotoksyczność porównywalną do wzorca (Efavirenz). Stężenie jednego ze związków wymagane do redukcji żywotności komórek MT-4 (ludzkich komórek CD4+ zawierających onkogenny genom HTLV-1) o 50 % wynosiło 2.4 μ M, co kwalifikowało ten związek do badań w kierunku aktywności przeciwnowotworowej. Spośród wszystkich badanych związków jedna pochodna wykazała aktywność w stosunku do wirusa HIV-1, taką samą jak lek referencyjny. Dla wytypowanych związków badano wpływ na: ruchliwość spontaniczną i wywołaną podaniem amfetaminy, koordynację ruchową myszy (test obracającego się pręta i test komina), ciepłotę ciała myszy, reakcje „potrząsania głową” po podaniu 5-hydroksytryptofanu, drgawki pentetrazolowe oraz oceniano właściwości antynocyceptywne w teście „przeciągania”. Wśród sześciu badanych związków największą aktywność wykazała pochodna 1-(2-(1*H*-indol-3-ilo)etylo)-3-benzylotiomocznika. Zwieńczeniem pracy badawczej było opublikowanie wyników w wysoko punktowanym czasopiśmie naukowym (**O5**) oraz przedstawienie ich na kilku konferencjach krajowych (**K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7**).

Mój dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 5 publikacji oryginalnych, 7 komunikatów prezentowanych na krajowych konferencjach naukowych. Całkowity IF artykułów opublikowanych przez obronę pracy doktorskiej wynosi 4.193, a ich wartość odpowiada 74 punktom MNiSW.

b) Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W 2013 roku odebrałem Nagrodę Naukową JM Rektora II stopnia za działalność naukową, jednocześnie nie przedłużono ze mną umowy. Katedra i Zakład Chemii Medycznej WUM została rozwiązana. Zaistniała sytuacja zmusiła mnie do rozwijania swoich kompetencji poza strukturą uczelni. W dalszym ciągu współpracowałem z promotorem pracy doktorskiej Prof. dr hab. Martą Strugą w ramach Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Przez blisko 3 lata na zasadach wolontariatu prowadziłem dalszą działalność naukową. W tym okresie udało mi się dokończyć projekty badawcze dotyczące poszukiwania aktywnych biologicznie policyklicznych imidów oraz wzbogacić o nowe dane otrzymane tiomocznikowe pochodne. W dalszym ciągu utrzymywałem podjęte współprace m. in. z dr hab. Joanną Stefańską (Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM) oraz grupą badawczą Prof. Anny E. Kozioł z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W efekcie opublikowane zostały wyniki kontynuowanych prac badawczych dla otrzymanych przeze mnie związków: analiza strukturalna otrzymanych pochodnych butyloaryloperazynowych, tiosemikarbazydu

oraz indanocyklonu (**O6**, **O7**, **O11**). W wyniku dużej skuteczności wobec biofilmu bakteryjnego pochodne tiazolowe oraz triazolowe doczekały się upublicznienia rezultatów badań (**O8**, **O9**), również na krajowych i międzynarodowych konferencjach (**K8**, **K9**). Pochodne tiomocznikowe tryptaminy okazały się interesującym obiektem do badań w zakresie określenia aktywności cytotoksycznej i przeciwwirusowej otrzymanych związków, molekularnych mechanizmów aktywności przeciwwirusowej, a także w zakresie badania powinowactwa do receptorów serotoninowych (zespoły badawcze Prof. Paolo La Colla i Prof. Ferdinando Fiorino). Rezultaty multidyscyplinarnych badań zostały przedstawione w pracach **O12** i **O13**. Prowadzone przeze mnie badania nad wykorzystaniem reakcji desulfuryzacji i cyklizacji pochodnych tiomocznikowych wzbogaciły pracę badawczą wewnątrz Zespołu Katedry i Zakładu Biochemii, a w efekcie ciągłej współpracy z dr hab. Anną Bielenicą powstała jedna z pierwszych publikacji wykorzystująca rezultaty moich prac (**O10**).

Mój dorobek po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 13 publikacji oryginalnych, 2 komunikaty prezentowane na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Całkowity IF artykułów opublikowanych po obronie pracy doktorskiej wynosi 38.470, a ich wartość odpowiada 635 punktom MNiSW.

6. Pozostałe publikacje oryginalne

O1. Krawiecka M, Kuran B, **Szulczyk D**, Kossakowski J, Szymanek K, Młynarczyk G. Synthesis and preliminary evaluation of antimicrobial activity of selected derivatives of 2-benzofurancarboxylic acid. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DDD: Pharmacia*, 2010; 23(4):11-18.

O2. Mirosław B, **Szulczyk D**, Koziol AE, Struga M. 4-(3-Fluorophenyl)-1-(propan-2-ylidene)thiosemicarbazone. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. 2011 Nov;67(Pt 11):o3010.

O3. Dobrowolski MA, Struga M, **Szulczyk D**. 6-Bromo-2-methyl-sulfanyl-1,3-benzothiazole. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. 2011 Dec 1;67(Pt 12):o3446-7.

O4. **Szulczyk D**, Struga M. 4-Hydroxy-1-methyl-7-(propan-2-yl)-4-azatricyclo [5.2.2.0^{2,6}]undec-8-ene-3,5-dione. *Molbank*, 2012; 3:1-3

O5. Stefanska J, **Szulczyk D**, Koziol AE, Mirosław B, Kedzierska E, Fidecka S, Busonera B, Sanna G, Giliberti G, La Colla P, Struga M. Disubstituted thiourea derivatives and their activity on CNS: synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*. 2012 Sep; 55:205-13.

O6. Szulczyk D, Bielenica A, Dobrowolski MA, Dobrzycki L, Krawiecka M, Kuran B, Struga M. Synthesis and structure evaluation of new complex butylarylpiperazin-1-yl derivatives. *Med Chem Res.* 2014;23(3):1519-1536.

O7. Sert Y, Mirosław B, Çırak Ç, Doğan H, **Szulczyk D**, Struga M. Vibrational spectroscopy (FT-IR and Laser-Raman) investigation, and computational (M06-2X and B3LYP) analysis on the structure of 4-(3-fluorophenyl)-1-(propan-2-ylidene)-thiosemicarbazone. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014 Jul 15; 128:91-9.

O8. Stefanska J, Nowicka G, Struga M, **Szulczyk D**, Koziol AE, Augustynowicz-Kopec E, Napiorkowska A, Bielenica A, Filipowski W, Filipowska A, Drzewiecka A, Giliberti G, Madeddu S, Boi S, La Colla P, Sanna G. Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating a 2-aminothiazole scaffold. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2015;63(3):225-36.

O9. Stefanska J, Stepień K, Bielenica A, **Szulczyk D**, Mirosław B, Koziol AE, Sanna G, Iuliano F, Madeddu S, Jozwiak M, Struga M. Antimicrobial and Anti-biofilm Activity of Thiourea Derivatives Bearing 3-amino-1H-1,2,4-triazole Scaffold. *Med Chem.* 2016;12(5):478-88.

O10. Bielenica A, **Szulczyk D**, Olejarz W, Madeddu S, Giliberti G, Materek IB, Koziol AE, Struga M. 1H-Tetrazol-5-amine and 1,3-thiazolidin-4-one derivatives containing 3-(trifluoromethyl)phenyl scaffold: Synthesis, cytotoxic and anti-HIV studies. *Biomed Pharmacother.* 2017 Oct; 94:804-812.

O11. Dobrowolski MA, Roszkowski P, Struga M, **Szulczyk D**. The unexpected product of Diels-Alder reaction between “indanocyclon” and maleimide. *J Mol Struct.* 2017; 1130:573-578.

O12. Sanna G, Madeddu S, Giliberti G, Piras S, Struga M, Wrzosek M, Kubiak-Tomaszewska G, Koziol AE, Savchenko O, Lis T, Stefanska J, Tomaszewski P, Skrzycki M, **Szulczyk D**. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Indole-Derived Thioureas. *Molecules.* 2018 Oct 7;23(10):2554.

O13. Szulczyk D, Bielenica A, Kędzińska E, Leśniak A, Pawłowska A, Bujalska-Zadrożny M, Saccone I, Sparaco R, Fiorino F, Savchenko O, Struga M. G protein-coupled receptor binding and pharmacological evaluation of indole-derived thiourea compounds. *Arch Pharm (Weinheim).* 2020 Feb;353(2): e1900218.

7. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

K1. Anna E. Koziół, Aleksandra Drzewiecka, Barbara Mirosław, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga. Selektywność reakcji 3-amino-1,2,4-triazolu z izotiocyanianami. 53 Konwersatorium Krystalograficzne, 30 czerwca – 1 lipca 2011, Wrocław

K2. Barbara Mirosław, **Daniel Szulczyk**, Anna E. Koziół, Marta Struga. Structural study of tryptamine derivatives. 54 Zjazd Naukowy PTChem i SITPChem, 18-22 września 2011, Lublin.

K3. Aleksandra Sawczenko, Barbara Mirosław, Anna E. Koziół, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga. Konformacje fragmentu tryptaminy w pochodnych zawierających grupę tiomocznikową. 55 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 16-20 września 2012, Białystok

K4. Aleksandra Sawczenko, Barbara Mirosław, Anna E. Koziół, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga. Modyfikacja oddziaływań międzycząsteczkowych w kryształach dipodstawionego tiomocznika. 54 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław 5 - 6 lipca 2012 r.

K5. **Daniel Szulczyk**, Marta Struga, Aleksandra Sawczenko, Barbara Mirosław, Anna E. Koziół, Ewa Kędzierska, Sylwia Fidecka Synthesis, structure and pharmacological evaluation of selected tryptamine thiourea derivatives. V Konwersatorium Chemii Medycznej, 13-15.09.2012 Lublin.

K6. Aleksandra Sawczenko, Barbara Mirosław, Anna E. Koziół, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga. Wpływ podstawnika na konformacje układu pochodnych tryptaminowych tiomocznika. X Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików - ChemSession'13, 17 maja 2013

K7. Anna E. Koziół, Barbara Mirosław, Aleksandra Sawczenko, **Daniel Szulczyk**, Anna Bielenica, Marta Struga, Hanna Małuszyńska. Pochodne N,N'-dipodstawionego tiomocznika jako syntony supramolekularne. 56 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 16-20.09.2013, Siedlce – wykład.

K8. Barbara Mirosław, Anna E. Koziół, Joanna Stefanska, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga Copper Coordination Compounds As Antimicrobial Agents. Trends in Drug Research; The 32nd Cyprus Noordwijkeroth Camaerino Symposium 18–22.05.2014, Limassol, Cyprus – wykład.

K9. Barbara Mirosław, Paweł Rejmak, Ewa Broclawik, Aleksandra Drzewiecka-Antonik, Hanna Małuszyńska, Anna Bielenica, **Daniel Szulczyk**, Marta Struga, Anna E. Koziół. Badania

nad selektywnością reakcji 3- i 4-amino-1,2,4-triazoli z izotiocyanianami. 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 14-18.09.2014, Częstochowa – wykład.

8. Współpraca naukowa

a) Krajowe ośrodki naukowe

- Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM; dr hab. Joanna Stefańska – w zakresie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych związków
- Pracownia Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr Michał Adam Dobrowolski - w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych związków
- Pracownia Chemii Związków Naturalnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr hab. Piotr Roszkowski – w zakresie syntezy organicznej oraz badań spektroskopowych
- Zakład Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie; Prof. dr hab. Anna E. Kozioł – w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych związków
- Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakogenomiką Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; dr Ewa Kędziarska – w zakresie badań behawioralnych pochodnych tiomocznika/tetrazolu na ośrodkowy układ nerwowy zwierząt
- Pracownia Teorii Biopolimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr hab. Sebastian Kmiecik oraz Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN; dr Michał Koliński - w zakresie modelowania molekularnego pochodnych tetrazolu do białek receptorowych
- Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmaceutyczny WUM; dr Małgorzata Wrzosek - w zakresie badań molekularnych mechanizmów aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków oraz dr Wioletta Olejarz – w zakresie badań cytotoksyczności pochodnych tiomocznika/tetrazolu
- Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie; Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, dr Agnieszka Napiórkowska – w zakresie określenia aktywności przeciwgruźliczej otrzymanych związków
- Instytut Fizyki PAN w Warszawie; dr Aleksandra Drzewiecka-Antonik – w zakresie badań spektroskopowych i obliczeń kwantowo-mechanicznych kompleksowych pochodnych tiomocznika/tetrazolu

b) Zagraniczne ośrodki naukowe

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università degli Studi di Cagliari, Monserrato, Włochy; Prof. Paolo La Colla, dr Gabriele Giliberti, dr Giuseppina Sanna – w zakresie określenia aktywności cytotoksycznej, przeciwo proliferacyjnej i przeciwwirusowej otrzymanych związków, a także molekularnych mechanizmów aktywności przeciwwirusowej
- Dipartimento di Farmacia Università di Napoli “Federico II”, Neapol, Włochy; Prof. Ferdinando Fiorino – w zakresie badania powinowactwa otrzymanych związków do receptorów serotoninowych

9. Udział w projektach badawczych

- 2011 - 2013, grant „Młody Naukowiec” nr. 1M8/PM11/11 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (O5).

10. Staże naukowe

- 08.2019 Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, „Syntetyczne modyfikacje pochodnych tiosemikarbazydowych oraz tiomocznowych”.

11. Nagrody i stypendia za działalność naukową

Jestem laureatem Nagród Naukowych JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach: 2013, 2019 i 2020 roku.

12. Działalność organizacyjna

W 2013 roku byłem członkiem Komisji Rekrutacyjnej WUM.

13. Recenzje prac naukowych

Od stycznia 2019 występowałem w roli recenzenta 21 razy dla 13 prac oryginalnych złożonych do publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *European Journal of Medicinal Chemistry* (3), *Pharmaceuticals* (3), *Crystals* (1), *Antibiotics* (2), *Molecules* (4).

14. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 18 prac naukowych oryginalnych (13 po uzyskaniu stopnia doktora), przy czym w 10 pracach byłem autorem pierwszym lub korespondencyjnym.
- 9 streszczeń z doniesień zaprezentowanych na konferencjach naukowych

- sumaryczny współczynnik Impact Factor według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: 42.663; łączna punktacja MNiSW: 709 pkt
- liczba wszystkich cytowań publikacji według bazy Web of Science™ Core Collection: 153 (157 wg bazy Scopus)
- liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science™ Core Collection: 126 (130 wg bazy Scopus)
- index Hirscha (h-index) według Web of Science™ Core Collection: 8 (8 wg bazy Scopus)

15. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę

- od 2018 prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotu „Biochemia z elementami chemii” dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- w latach 2008 - 2013 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych i wykładowych z przedmiotu „Chemia medyczna” dla studentów I roku I Wydziału Lekarskiego, II Wydziału Lekarskiego oraz Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- w latach 2008 - 2013 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych i wykładowych z przedmiotu „Chemia medyczna” w języku angielskim dla studentów I roku Oddziału English Division

Daniel Szulczyk