

JOLANTA SOLECKA

**NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO –
PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY**

AUTOREFERAT

Warszawa, październik 2012 r.

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych (j. polski, j. angielski)

Autoreferat

„Charakterystyka właściwości biologicznych, w tym przeciwdrobnoustrojowych, inhibitorów DD-peptydaz wytwarzanych przez szczep *Streptomyces* sp. 8812 oraz uzyskanych na drodze syntezy chemicznej”

1. Imię i Nazwisko: Jolanta Solecka

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

- magister chemii, 1983 r., Warszawa, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski;

Pracę magisterską, której tematem była „Synteza analogu wazopresyny metodą fazy stałej” wykonałam w Zakładzie Chemii Organicznej, Pracowni Peptydów, Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł magistra uzyskałam 14 lipca 1983 roku.

- doktor n. farmaceutycznych, 1996 r., Warszawa, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Warszawie;

Pracę doktorską, której tematem było „Poszukiwanie i badanie zewnątrzkomórkowych DD-karboksypeptydaz wytwarzanych przez promieniowce” wykonałam w Samodzielnej Pracowni Promieniowców i Grzybów Niedoskonałych Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie oraz częściowo w Laboratorium Enzymologii Centrum Inżynierii Białek Uniwersytetu w Liège (Belgia). Pracę doktorską obroniłam 13 listopada 1996 r.

W okresie od początku zatrudnienia do obrony pracy doktorskiej byłam współautorem:

- czterech publikacji w czasopismach posiadających IF (wykaz opublikowanych prac tabela II A, poz. 16-19),
- dwóch rozdziałów w podręcznikach (wykaz opublikowanych prac tabela II D, poz. 11, 12),
- jedenastu doniesień na zjazdach naukowych (wykaz opublikowanych prac tabela III B, poz. 1-11),
- realizowałam jako wykonawca jeden grant (wykaz opublikowanych prac tabela II; I, poz. 11).

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

Od 28.11.1983 r. do chwili obecnej jestem zatrudniona w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny (początkowo na etacie stażysty)

od 1.07 1984 r. - na stanowisku chemika

od 1.02.1986 r. - na stanowisku asystenta

od 1.07.1999 r. - na stanowisku adiunkta

od 16.10. 2009 r. – pełnię funkcję kierownika Samodzielnej Pracowni Związków Biologicznie Czynnych NIZP - PZH (i kieruję 5-osobowym zespołem badawczym)

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego, (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

„Charakterystyka właściwości biologicznych, w tym przeciwdrobnoustrojowych, inhibitorów DD-peptydaz wytwarzanych przez szczep *Streptomyces* sp. 8812 oraz uzyskanych na drodze syntezy chemicznej”

1. **Solecka J.**, Rajnisz A., Laudy A. E.: A novel isoquinoline alkaloid, DD-carboxypeptidase inhibitor, with antibacterial activity isolated from *Streptomyces* sp. 8812. Part I: Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 62, 575-580 (2009), IF 1,628.
2. **Solecka J.**, Sitkowski J., Bocian W., Bednarek E., Kawecki R., Kozerski L.: A novel isoquinoline alkaloid, DD-carboxypeptidase inhibitor, with antibacterial activity isolated from *Streptomyces* sp. 8812. Part II: Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.* 62, 581-585 (2009), IF 1,628.
3. **Solecka J.**, Rajnisz A., Postek M., Zajko J., Kawecki R., Havlicek V., Bednarek E., Kozerski L.: N-acetyl-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, a second identified bioactive metabolite produced by *Streptomyces* sp. 8812. *J. Antibiot.* 65, 219-221 (2012), IF 1,651.
4. Panfil I., Urbańczyk-Lipkowska Z., Suwińska K., **Solecka J.**, Chmielewski M.: Synthesis of pyrazolidinone analogs of β -lactam antibiotics. *Tetrahedron* 58, 1199-1212 (2002), IF 2,420.
5. Cierpucha M., **Solecka J.**, Frelek J., Szczukiewicz P., Chmielewski M.: Synthesis, biological, and chiroptical activity of 3-phenyl-clavams. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 405-416 (2004), IF 2,018.
6. Cierpucha M., Panfil I., Danh T.T., Chmielewski M., Kurzatkowski W., Rajnisz A., **Solecka J.**: Synthesis of 3-substituted-clavams: antifungal properties, DD-peptidase and β -lactamase inhibition. *J. Antibiot.* 60, 622-632 (2007), IF 1,296.
7. Borsuk K., Kazimierski A., **Solecka J.**, Urbańczyk-Lipkowska Z., Chmielewski M.: Stereocontrolled formation of oxacephams from carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 337, 2005-2015 (2002), IF 1,631.
8. Danh T. T., Borsuk K., **Solecka J.**, Chmielewski M.: An entry to 7-amino- and to 2-ethoxycarbonyl-5-dethia-5-oxa-cephams from 1,3-alkylidene L-erythritol. *Tetrahedron* 62, 10928-10936 (2006), IF 2,817.

9. Solecka J., Łysek R., Furman B., Chmielewski M., Kurzątkowski W.: Practical use of DD-peptidase 64-575 for assay the inhibition activity of natural and synthetic compounds. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 60 (2), 115-118 (2003).

10. Kozioł A., Altieri E., Furman B., **Solecka J.,** Chmielewski M.: Quinidine catalyzed reaction between 4-formyloxazetidin-2-one and some thiophenols, thiols and alcohols. *ARKIVOC* 4, 37-53 (2011), IF 1,252.

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Moje zainteresowania naukowe dotyczą poszukiwania związków biologicznie czynnych wytwarzanych przez promieniowce oraz otrzymanych na drodze syntezy chemicznej. Pierwszy nurt dotyczy badań przeglądowych aktywności w kolekcji promieniowców NIZP - PZH w celu znalezienia szczepu produkującego związki przeciwbakteryjne, hamujące aktywność DD-karboksy-peptydaz/transpeptydaz (enzymów biorących udział w biosyntezie ściany komórkowej bakterii) oraz określenia struktury chemicznej poznanych metabolitów. W celu oceny bezpieczeństwa oraz przydatności stosowania w przyszłości wyodrębnionych związków w leczeniu, prowadziłam badania innych właściwości biologicznych, w tym aktywności hemolitycznej i genotoksyczności. Natomiast, aby sprawdzić specyficzność działania wyodrębnionych związków jako inhibitorów DD-karboksy-peptydaz/transpeptydaz (DD-peptydaz) badałam również ich zdolność hamowania aktywności innych enzymów proteolitycznych (elastazy, karboksy-peptydazy A, trombiny, trypsyny, papainy, endoproteinazy Glu-C, pepsyny). Mechanizm przeciwbakteryjnego działania poszukiwanych przeze mnie związków, analogicznie do antybiotyków β -laktamowych polega na inhibicji DD-peptydaz.

Bioaktywne metabolity to związki będące produktami pierwotnego, lub wtórnego metabolizmu różnych organizmów (roślin, zwierząt, drobnoustrojów) posiadające aktywność biologiczną¹. Wtórne metabolity są zazwyczaj bardzo zróżnicowane pod

¹ Demain A.L., Sanchez S.: Microbial drug discovery: 80 years of progress, *J. Antibiot.* 62, 5-16, 2009.

względem budowy chemicznej, która często jest unikatowa i nowa, charakteryzują się ponadto małą masą cząsteczkową. Do tej pory poznano ponad 1 mln naturalnych metabolitów, w tym ok. 250 tys. bioaktywnych. Około 5 % ze wszystkich odkrytych związków pochodzenia naturalnego ma pochodzenie mikrobiologiczne. Spośród wtórnych metabolitów drobnoustrojów około 45 % wytwarzają promieniowce, w szczególności z rodzaju *Streptomyces*. Do tej pory z bakterii *Streptomyces* spp. wyodrębniono około 7600 metabolitów stanowiących najbogatsze źródło antybiotyków i różnych związków znajdujących zastosowanie jako leki^{2,3}.

Wśród naturalnych związków o działaniu antybiotycznym, wytwarzanych przez szczepy *Streptomyces* spp. znajdują się: β -laktamy, aminoglikozydy, aminocyklitole, tetracykliny, cykliczne peptydy, glikopeptydy, glikolipopeptydy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, ansamycyny, chloramfenikol, fenylopropanoidy i inne^{3,4,5}.

Wtórne metabolity mają szerokie zastosowanie m. in. w medycynie, weterynarii czy rolnictwie. Wykorzystuje się ich działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunosupresyjne, przeciwnowotworowe oraz hipocholesterolemiczne. Znalazły również zastosowanie w leczeniu chorych z zakażeniami pasożytniczymi. Bioaktywny metabolit, kwas klawulanowy produkowany przez *Streptomyces clavuligerus* hamuje aktywność β -laktamaz³.

Od dziesięcioleci postępuje wzrost oporności bakterii na antybiotyki. Rozszerzanie się oporności bakterii na antybiotyki z różnych grup, w tym także na antybiotyki β -laktamowe, znacznie ogranicza skuteczność aktualnie stosowanych leków i powoduje potrzebę poszukiwania nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych^{6,7}. Obecnie, szczególnie niebezpieczne są zakażenia szpitalne wywołane przez patogeny Gram-dodatnie: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* (oporne na wankomycynę),

² Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58,1, 1-26, 2005.

³ Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. Biologically Active Secondary Metabolites from Actinomycetes. Cent. Eur. J. Biol. 7 (3), 373-390, 2012.

⁴ Singh M.P., Greenstein M. Antibacterial leads from microbial natural products discovery. Curr. Opin. in Drug Discov. Devel. 3: 167-176, 2000.

⁵ Solecka J., Zajko J., Rajnisz A., Laskowska A., Guśpiel A. Promieniowce - występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych Post. Mikrobiol., 2012, w druku.

⁶ Livermore D.M.: Introduction: the challenge of multiresistance. Int. J Antimicrob. Agents 29 Suppl. 3 S1-S7, 2007.

⁷ Walsh C.T.: Antibiotics: Action, Origin, Resistance. ASM Press, Washington, DC, 2003.

metycylooporne gronkowce *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* odporne na penicylinę, *Clostridium difficile* oraz pałeczki Gram-ujemne: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* zwłaszcza wytwarzające β -laktamazy typu ESBL, KPC, MBL⁸.

Poszukiwania nowych związków przeciwbakteryjnych prowadzone są różnymi metodami, np. metodami chemii kwantowej, z wykorzystaniem techniki SAR (Structure Activity Relationship), racjonalnym projektowaniem leków RDD (Rational Drug Design), innymi technologiami komputerowymi oraz poprzez przegląd drobnoustrojów wytwarzających związki czynne^{9,10,11}. W swojej pracy poszukiwanie promieniowców wytwarzających związki hamujące aktywność białek PBP (penicillin binding protein) prowadziłam przy zastosowaniu DD-peptydazy 64-575^{12,13}.

DD-karboksy-peptydazy/transpeptydazy są enzymami biorącymi udział w ostatnim etapie biosyntezy, poprzecznym sieciowaniu peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii^{14,15,16}. Białka o tej aktywności enzymatycznej są punktem uchwytu antybiotyków β -laktamowych. Występują jedynie w komórkach bakteryjnych, natomiast nie są obecne w komórkach ssaków, co jest czynnikiem bardzo korzystnym. Najważniejszymi inhibitorami DD-peptydaz (białek wiążących penicylinę) o aktywności przeciwbakteryjnej są antybiotyki β -laktamowe. Ponadto inne znane inhibitory DD-peptydaz to γ -laktamy i pirazolidynony, lecz wykazują one dość słabą aktywność przeciwbakteryjną^{17,18}.

⁸ Walsh Ch. & Wright G.D.: Antimicrobials, Current Op. Microbiol. 12, 473-475, 2009.

⁹ Baker, D.D., Chu, M., Oza, U. & Rajgarhia, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Nat. Prod. Rep. 24, 1225-1244, 2007.

¹⁰ Imanaka, H. Screening microbial products for medicine. Actinomycetologica 14, 22-26, 2001.

¹¹ Solecka J., Zajko J., Rajnisz A., Postek M.A. Searching for novel bioactive compounds derived from nature Gazeta Farmaceutyczna, XXI, 1(237), 36-38, 2012.

¹² Solecka J. Poszukiwanie i badanie zewnątrzkomórkowych DD-karboksy-peptydaz wytwarzanych przez promieniowce, praca doktorska, PZH, 1996 r.

¹³ Solecka J., Kurzątkowski W. Powinowactwo zewnątrzkomórkowej DD-karboksy-peptydazy/ transpeptydazy szczepu *Saccharopolyspora erythraea* PZH TZ 64-575 do związków β -laktamowych. Med. Dośw. Mikrobiol. 51, 151-165, 1999.

¹⁴ Waxman, D.J. & Strominger, J.L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. Ann. Rev. Biochem. 52, 825-969, 1983.

¹⁵ Ghuysen, J.-M. Bacterial active-site serine penicillin-interactive proteins and domains: mechanism, structure, and evolution. Rev. Infect. Dis. 10, 726-732, 1988.

¹⁶ Solecka Kurzątkowski W DD-karboksy-peptydazy/transpeptydazy Post. Mikrobiol. XXXVII, 1, 33-56, 1998.

¹⁷ Nozaki Y., Katayama N., Harada S., Ono H., Okazi H.: Laktawicin, a naturally occurring non- β -lactam antibiotic having β -lactam-like action: biological activities and mode of action. J. Antibiot. 42, 84-93, 1989.

¹⁸ Junghein L.N., Ternansky R.J.: Non- β -lactam mimics of β -lactam antibiotics, pp. 306-324 w: The chemistry of β -lactams (ed): M.I. Page, Blackie, Glasgow 1992.

Większość antybiotyków współcześnie stosowanych w leczeniu to związki wytwarzane przez drobnoustroje, lub ich analogi^{4,19,20}.

Antybiotyki pozyskane z hodowli drobnoustrojów, wykorzystuje się do dalszych modyfikacji enzymatycznych, lub chemicznych. Mogą one być również podstawą do syntezy nowych analogów.

Moje zainteresowania naukowe od czasu doktoratu poświęcone poszukiwaniu i badaniu zewnątrzkomórkowych DD-peptydaz poszerzyłam o poszukiwanie nowych związków aktywnych wobec bakterii o wybiórczym mechanizmie działania polegającym na inhibicji białek PBP. Jako detektor stosowałam DD-peptydazę 64-575, enzym uprzednio przez mnie wyizolowany i scharakteryzowany^{12,13}.

Pierwszym celem moich prac była identyfikacja nowych związków otrzymanych na drodze biosyntezy przez szczep promieniowca *Streptomyces* sp. 8812, specyficznych inhibitorów DD-peptydaz (EC 3.4.16.4) i ich przebadanie w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej. Ponadto określiłam inne właściwości biologiczne wytypowanych związków. Po zidentyfikowaniu metodami fizykochemicznymi struktury chemicznej dwóch wyizolowanych metabolitów zleciłam ich syntezę chemiczną, aby potwierdzić ich budowę. Następnie przebadalam syntetyczne analogi i potwierdziłam prawidłowość zaprojektowanej struktury obydwu wyizolowanych metabolitów. Jednym z wyizolowanych metabolitów jest nowy związek, który do tej pory nie był opisany. Należy on do grupy alkaloidów izochinoliny. Jako pierwsza wykazałam, że związek należący do ww. alkaloidów może mieć aktywność hamującą DD-peptydazy, tym samym białek PBP, punktu wiązania antybiotyków β -laktamowych z komórkami bakteryjnymi. Należy zauważyć, że nowy, wykryty przez mnie związek jednocześnie nie jest podatny na inhibicję β -laktamaz klasy A. β -laktamazy te stanowią jeden z podstawowych problemów nieskuteczności terapii zakażeń wywołanych przez Gram-ujemne pałeczki, wytwarzające enzymy typu ESBL. Tym samym nowy związek, lub jego analogi może stanowić bardzo obiecującą strukturę

¹⁹ Newman D., Gordon M.C., Snader K.M.: The influence of natural products upon drug discovery. Nat. Prod. Rep. 17, 215-234, 2000.

²⁰ Cordier Ch., Morton D., Murrison S., Nelson A., O'Leary-Steele C.: Natural products as an inspiration in the diversity-oriented synthesis of bioactive compound libraries. Nat. Prod. Rep. 25, 719-737, 2008.

wiodącą dla przyszłych leków przeciwbakteryjnych. Własność intelektualną zabezpieczono zgłoszeniami patentowymi: **Solecka J.**, Kawęcki R., Kozerski L., Nr: P 388577 (2009); **Solecka J.**, Kozerski L.: PCT/PL2008/050013 (Europa), No. 08828485.6-2101 (2010) oraz patentami: **Solecka J.**, Kozerski L., Nr: P 383211 (2012); **Solecka J.**, Kozerski L.: PCT/PL2008/050013 (USA) No. 12/675,348, §371 (2012).

Następnym celem moich prac było znalezienie nowych specyficznych inhibitorów DD-peptydaz (EC 3.4.16.4) i β -laktamaz, wśród wytypowanej grupy związków β -laktamowych z modyfikowanymi układami monocyklicznymi, bi- i tricyklicznymi (klawamy, oksacefamy) z podstawionymi atomami węgla w pierścieniu, atomem azotu, tlenu, wprowadzonymi różnymi podstawnikami, a także związków γ -laktamowych (pirazolidynony) otrzymanych na drodze syntezy chemicznej. W 1998 r. nawiązałam trwającą do tej pory współpracę z grupami chemików z Instytutu Chemii Organicznej PAN, gdzie prowadzona była synteza związków. Badałam również właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze zsyntetyzowanych związków. Do określenia zdolności hamowania aktywności enzymatycznej tak jak uprzednio, zastosowałam DD-peptydazę 64-575.

Poszerzenie obszaru badawczego o związki syntetyczne zwiększa szanse na znalezienie substancji wykazujących aktywność biologiczną w grupie nowych cząsteczek oraz poszerza zakres wiedzy o ich właściwościach. Jest uzupełnieniem badań przesiewowych wysokiej wydajności [High Throughput Screening (HTS)], którymi zajmują się firmy farmaceutyczne. Wyniki, przeprowadzanych przeze mnie badań aktywności biologicznej syntetycznych związków o różnej budowie uzupełniają podstawowe informacje o ich właściwościach. Zamieszczane są w bazach danych, pokazują kierunek dalszych modyfikacji cząsteczek, aby podwyższyć ich aktywność i poprawić właściwości fizykochemiczne, w tym rozpuszczalność w środowisku wodnym. Wśród badanych związków wykazałam umiarkowaną, lub niską aktywność inhibicji w.w. enzymów. Należy kontynuować prace dotyczące modyfikacji układów β -laktamowych, w celu zwiększenia aktywności biologicznej związków. Poznanie

właściwości biologicznych związków umożliwia przeprowadzenie analizy zależności między aktywnością biologiczną, a strukturą chemiczną co pozwoli na syntezę nowych cząsteczek z wykorzystaniem techniki SAR.

Podsumowanie wyników:

1/ Określiłam strukturę chemiczną oraz właściwości biologiczne i fizykochemiczne dwóch wtórnych metabolitów (JS-1, JS-2) wytwarzanych przez szczep promieniowca *Streptomyces* sp. 8812 [1-3],

- pierwszy odkryty metabolit, alkaloid izochinoliny (JS-1) nie był do tej pory opisany w chemicznych i farmaceutycznych bazach danych. Wyniki moich badań poszerzają więc zakres wiedzy podstawowej [1,2],

- wykazałam zdolność hamowania aktywności DD-peptydaz oraz właściwości przeciwbakteryjne obydwu związków. Struktury cząsteczek mogą posłużyć jako związki wyjściowe do modyfikacji chemicznych, w celu poprawienia ich aktywności biologicznej [1-3].

2/ Scharakteryzowałam pod względem właściwości biologicznych, koncentrując się głównie na aktywności inhibicji DD-peptydaz, β -laktamaz oraz właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, kilkadziesiąt związków organicznych o różnych strukturach chemicznych, w tym β -laktamowej i pirazolidynonu, które uzyskano na drodze syntezy chemicznej we współpracy z IChO PAN w Warszawie [4-10],

- dane opublikowane w artykułach stanowią bazę informacji dotyczących właściwości testowanych związków, która będzie wykorzystana do dalszych prac umożliwiających poszukiwanie szczególnie aktywnych analogów, ich syntezy, bądź projektowania [1-10],

- kilka spośród przebadanych przeze mnie związków: (3'S, 4'R) 5-deoksy-1,2-O-izopropylideno-3-O:5-C-(3'-metyloazetydyn-2'-on-1',4'-diyl)- α -D-ksylofuranosa (I) oraz (3'R, 4'R) 5-deoksy-1,2-O-izopropylideno-3-O:5-C-(3'-trimetylosililoetylo-

azetydyn-2'-on-1',4'-diyl)- α -D-ksylofuranosa (III) [9], a także (3*R*,5*R*) 3-fenylolklawam (30) [5] wykazuje wysoką aktywność biologiczną; należy poddać je modyfikacjom mającym na celu zwiększenie rozpuszczalności w środowisku wodnym,

- poprzez wyniki swoich badań dostarczam chemikom wskazówki dotyczące kierunku dalszych modyfikacji cząsteczek, w celu podwyższenia aktywności i poprawienia parametrów fizykochemicznych.

3/ Unikalnym narzędziem pracy była DD-peptydaza 64-575, którą oczyściłam w ramach doktoratu, stosowana w teście enzymatycznym. W ramach badań prowadzonych po doktoracie zmodyfikowałam test z wykorzystaniem DD-peptydazy 64-575, dostosowując go do właściwości badanych związków [9].

Omówienie publikacji stanowiących podstawę habilitacji

Publikacja [1] i [2]

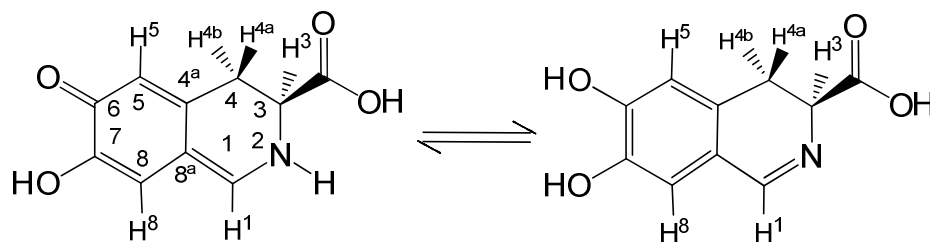
W celu znalezienia naturalnego związku o właściwościach przeciwbakteryjnych, inhibitora DD-peptydaz przeprowadziłam badania przeglądowe wśród szczepów promieniowców z kolekcji Samodzielnej Pracowni Promieniowców i Grzybów Niedoświadczonych NIZP-PZH. Do badań tych wykorzystałam zewnątrzkomórkową DD-karboksypeptydazę/transpeptydazę, którą wyodrębniłam i oczyściłam w ramach swojej pracy doktorskiej^{12,13}. Jako producenta wtórnych metabolitów o najwyższej aktywności wytypowałam szczep *Streptomyces* sp. 8812, zidentyfikowałam dwa metabolity wytwarzane przez ten szczep. Przeprowadziłam następujące etapy prac:

- Hodowlę oraz charakterystykę morfologiczną i biochemiczną drobnoustroju *Streptomyces* sp. 8812
- Wieloetapowe oczyszczanie bioaktywnego metabolitu
- Analizy fizykochemiczne (HPLC-MS, HR-MS NMR, IR, UV)
- Określenie struktury chemicznej inhibitora
- Określenie właściwości przeciwbakteryjnych inhibitora

- Badanie związku czynnego jako inhibitora DD-peptydaz
- Badania właściwości biologicznych związku syntetycznego, którego otrzymanie zleciłam Uniwersytetowi Przyrodniczo – Humanistycznemu w Siedlcach, w celu potwierdzenia struktury i aktywności wyodrębnionego naturalnego metabolitu.

Zaproponowany wzór sumaryczny pierwszego wyodrębnionego bioaktywnego metabolitu roboczo nazwanego JS-1 wynikający z dokładnego pomiaru masy przedstawia się następująco: $C_{10}H_9NO_4$. Masa cząsteczkowa związku wynosi 207,05 Da.

W bazie danych Beilstein (2006 r.) zamieszczono 640 struktur odpowiadających wzorowi sumarycznemu $C_{10}H_9NO_4$. Analiza danych fizykochemicznych, szczególnie widm NMR oraz zastosowanie programu ACD/Labs doprowadziło mnie do określenia struktury badanego inhibitora. Sugerowana struktura to układ alkaloidu izochinoliny, kwas 7-hydroksy-6-okso-2,3,4,6-tetrahydroizochinolino-3-karboksyłowy o konfiguracji (*S*) węgla asymetrycznego w położeniu C-3 (Ryc. 1). Forma ketonowa związku występuje w przewodzie.



Rycina 1. Struktura chemiczna alkaloidu izochinoliny JS-1.

Przedstawiony związek nie figuruje w bazach danych Beilstein oraz Chemical Abstracts. Jest to nowy związek z grupy alkaloidów izochinoliny.

W celu ostatecznego potwierdzenia struktury chemicznej metabolitu otrzymanego na drodze biosyntezy, przeprowadziłam analizę porównawczą danych spektroskopowych związku naturalnego i uzyskanego na drodze syntezy chemicznej (syntezę wykonano na Uniwersytecie Przyrodniczo – Humanistycznym w Siedlcach).

Wyniki analizy obydwu cząsteczek potwierdzają strukturę chemiczną metabolitu $C_{10}H_9NO_4$.

Przeprowadzone przeze mnie badania właściwości biologicznych metabolitu JS-1 wykazały, że jest on inhibitorem DD-peptydaz. W badaniach użyłam DD-peptydazę 64-575, która była przedmiotem mojego doktoratu oraz dostępną komercyjnie DD-peptydazę R-39 stosowaną do badań aktywności związków β -laktamowych, opisaną w piśmiennictwie²¹. Stężenie molowe kwasu 7-hydroksy-6-okso-2,3,4,6-tetrahydro-izochinolino-3-karboksyłowego hamujące o 50 % aktywność (IC_{50}) DD-peptydaz 64-575 oraz R-39 wynosi odpowiednio: $4,7 \times 10^{-6}$ mol/L oraz $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Jednocześnie zbadalam, że metabolit JS-1 jest stabilny w środowisku β -laktamaz i nie jest hydrolizowany przez β -laktamazy klasy A (według Amblera)²². Wartości IC_{50} niektórych antybiotyków β -laktamowych do omawianych DD-peptydaz są porównywalne do wartości IC_{50} zidentyfikowanego metabolitu JS-1. Warto podkreślić, że do tej pory nie były znane inhibitory DD-peptydaz z grupy związków o budowie izochinoliny. Prawdopodobnym jest, iż alkaloid JS-1 hamuje biosyntezę peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii, analogicznie do mechanizmu działania antybiotyków β -laktamowych.

Badania hamowania aktywności innych enzymów proteolitycznych przez związek JS-1 wykazały specyficzność inhibicji bakteryjnych DD-peptydaz. Ponadto wykazałam brak właściwości genotoksycznych oraz hemolitycznych alkaloidu JS-1.

Alkaloid JS-1 wykazuje właściwości przeciwbakteryjne. Najwyższą aktywność osiąga wobec szczepów referencyjnych: *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 (MIC 10 μ g/mL) i wobec metycylinoopornego *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MIC 40 μ g/mL). Poza tym hamuje wzrost następujących bakterii: *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *P. mirabilis* ATCC 12453 i *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (MIC dla badanych szczepów: 160 μ g/mL) oraz drożdżaków: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 (MIC dla

²¹ Dusart J. et al. DD-carboxypeptidase-transpeptidase and killing site of β -lactam antibiotics in *Streptomyces* strains R39, R61, and K11. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 3, 181-187 (1973).

²² Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley.: A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* 276, 269-70, (1991).

badanych szczepów: 240 $\mu\text{g/mL}$). Dla pozostałych szczepów wartości MIC badanej próbki wynosiły ponad 320 $\mu\text{g/mL}$. Dodatkowo przeprowadzone badania na 31 izolatach klinicznych *S. aureus*, w tym MRSA wykazały aktywność związku JS-1 wobec 30% izolatów (MIC 80 - 110 $\mu\text{g/mL}$). Uzyskane wartości MIC alkaloidu JS-1 dla izolatów klinicznych *S. aureus* były porównywalne do wartości MIC dla szczepu referencyjnego *S. aureus* ATCC 25923 (MIC 80 $\mu\text{g/mL}$). Nie zaobserwowano różnic aktywności związku JS-1 wobec szczepów klinicznych *S. aureus* wrażliwych (MSSA) i opornych (MRSA) na metycylinę.

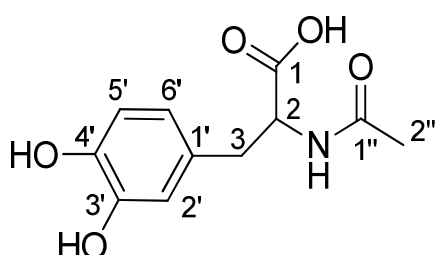
Relatywnie wysokie wartości MIC związku JS-1 w porównaniu do wartości IC_{50} hamowania aktywności DD-peptydaz prawdopodobnie są związane ze słabą przenikalnością alkaloidu JS-1 przez błony komórkowe bakterii. Wartości IC_{50} niektórych antybiotyków β -laktamowych do omawianych DD-peptydaz są porównywalne do wartości IC_{50} odkrytego nowego związku JS-1. Przewidywalnie niska lipofilowość cząsteczki JS-1 utrudnia jej transport do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie występują DD-peptydazy/PBPs (białka wiążące penicylinę), punkty uchwytu badanego związku oraz antybiotyków β -laktamowych.

Poznanie struktury aktywnego związku JS-1, hamującego działanie DD-peptydaz, wykazującego stabilność wobec działania β -laktamaz, o aktywności przeciwbakteryjnej może być istotne dla antybiotykoterapii. Związki o budowie alkaloidu izochinoliny nie były wcześniej znane jako inhibitory DD-peptydaz. Bioaktywne metabolity wytwarzane przez drobnoustrój *Streptomyces* sp. 8812 mogą być wykorzystane do dalszych modyfikacji chemicznych, enzymatycznych, lub mogą stanowić cząsteczki modelowe do syntezy nowych analogów celem podwyższenia ich aktywności przeciwbakteryjnej. Proponowana jest modyfikacja chemiczna prostego układu izochinoliny, która wpływa na wzrost lipofilności cząsteczki, a tym samym na ich większą przenikalność przez błony komórek bakterii.

Publikacja [3]

Przeprowadziłam prace związane z oczyszczaniem i charakteryzowaniem drugiego bioaktywnego metabolitu JS-2 wyodrębnionego z brzezki fermentacyjnej szczepu

Streptomyces sp. 8812. Wieloetapowe oczyszczanie substancji przeprowadziłam przy zastosowaniu m.in. SPE (Kolumny Polar-Plus), HPLC (kolumny ze złożem dC18). Po otrzymaniu całkowicie oczyszczonego związku określiłam jego strukturę chemiczną poprzez analizę widm NMR (jedno- i wielowymiarowych), HPLC-MS, HR-MS, IR, UV. Następnie potwierdziłam strukturę chemiczną metabolitu C₁₁H₁₃NO₅ o masie cząsteczkowej 239,07 Da poprzez porównanie danych spektroskopowych związku naturalnego i otrzymanego na drodze syntezy. Zidentyfikowany drugi bioaktywny metabolit wytwarzany przez szczep *Streptomyces* sp. 8812 to N-acetylo-3,4-dihydroksy-L-feniloalanina (JS-2) należąca do grupy protoalkaloidów (Ryc. 2).



Rycina 2. Struktura chemiczna protoalkaloidu JS-2.

Metabolit C₁₁H₁₃NO₅ wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *B. bronchiseptica*, *S. epidermidis* oraz *S. aureus* (MRSA, VRSA). Poza tym hamuje on aktywność DD-peptydaz 64-575, R-39 oraz karboksypeptydazy A z trzustki bydlęcej.

Związki o budowie β-feniloetyloamidu nie były wcześniej poznane jako inhibitory DD-peptydaz. Bioaktywne metabolity wytwarzane przez szczep *Streptomyces* sp. 8812 mogą być wykorzystane do dalszych modyfikacji chemicznych, enzymatycznych, lub mogą stanowić cząsteczki modelowe do syntezy nowych analogów celem podwyższenia ich aktywności przeciwbakteryjnej.

Publikacja [4]

W różnych laboratoriach na świecie syntetyzowano nową klasę nie-β-laktamowych analogów penicylin i cefalosporyn, pochodnych pirazolo-pirazolonów. Niektóre z nich wykazują wysoką aktywność przeciwbakteryjną. Także w IChO PAN na drodze syntezy chemicznej uzyskano grupy związków o budowie pirazolo-

pirazolonów oraz pirazolo-oksazynów. Przeprowadziłam badania inhibicji DD-peptydazy 64-575 przez szereg dziesięciu bi- i tricyklicznych pirazolidynonów.

Warunki reakcji enzymatycznej dostosowałam do ograniczeń rozpuszczalności testowanych związków. Reakcję prowadziłam w środowisku wodno-metanolowym (75 % : 25 %). Żaden z badanych pirazolidynonów, różniących się konfiguracją węgla asymetrycznych, podstawnikami, a także liczbą pierścieni, atomami heterocyklicznymi i ich liczbą w pierścieniach (atomy azotu i tlenu) w stężeniu 0,025 mol/L nie hamował aktywności DD-peptydazy 64-575. Być może obecność poliolowego-łańcucha bocznego (wielowodorotlenowego) w cząsteczkach była odpowiedzialna za brak aktywności biologicznej.

Publikacja [5]

Dość dobrze poznana jest zależność między strukturą chemiczną β -laktamów, a ich aktywnością przeciwbakteryjną. Wszystkie antybiotyki β -laktamowe mają konfigurację (*R*) węgla C-5 (penicyliny), lub C-6 (cefalosporyny). Monobaktamy i nokardycyny o konfiguracji (*4S*) lub (*4R*), czy bez centrum stereogenicznego przy węglu C-4 pierścienia azetydyn-2-owego zwykle wykazują niską aktywność przeciwbakteryjną.

Naturalne klawamy stanowią interesującą i unikatową grupę antybiotyków β -laktamowych, które występują w naturze jako stereoizomery zarówno o konfiguracji na węglu mostkowym (*5R*) jak i (*5S*). Spośród różnych, naturalnych klawamów, tylko kwas klawulanowy i jego proste *O*-acylo pochodne, o konfiguracji (*5R*) na węglu wspólnym dla obydwu pierścieni są silnymi inhibitorami β -laktamaz, a także wykazują słabą aktywność przeciwbakteryjną.

Inne klawamy, o konfiguracji (*S*) na węglu C-5 wykazują aktywność przeciwgrzybiczą oraz przeciwbakteryjną. Mechanizm działania przeciwgrzybiczego tych związków polega na interferencji w syntezę RNA u *Eukariota*. Natomiast mechanizm przeciwbakteryjny, polega na hamowaniu biosyntezy bakteryjnej metioniny, w przeciwieństwie do innych β -laktamów o konfiguracji (*R*), które hamują

biosyntezę peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii. Niestety, wiele związków zawierających pierścienie β -laktamowy nie wykazuje aktywności przeciwbakteryjnej.

Przeprowadziłam badania inhibicji DD-peptydazy 64-575 oraz β -laktamazy klasy A (Penase) przez osiem syntetycznych klawamów należących do dwóch grup. Pierwsza grupa związków z podstawnikiem fenyłowym przy węglu C-3 była zróżnicowana pod względem stereoizomerii dwóch asymetrycznych węgli [związki (30)-(33)]. Natomiast druga grupa klawamów z dodatkowym podstawnikiem metylowym przy węglu C-6 była zróżnicowana pod względem stereoizomerii trzech węgli asymetrycznych [związki (50)-(53)].

Związki (31)-(33) oraz (51)-(53) wykazywały jedynie śladową inhibicję DD-peptydazy 64-575. Związek (30) o konfiguracji węgli (*R,R*) hamował aktywność DD-peptydazy 64-575, a IC_{50} wynosiło $1,8 \times 10^{-4}$ mol/L, natomiast jego 6-metylo-pochodna, związek (50) o konfiguracji węgli (*R,R*) wykazywał niższą aktywność, $IC_{50} = 4,2 \times 10^{-3}$ mol/L. Obydwa klawamy hamowały aktywność DD-peptydazy 64-575 w stężeniach wyższych niż kwas klawulanowy ($IC_{50} = 2,0 \times 10^{-5}$ mol/L), natomiast związek (30) hamował aktywność DD-peptydazy 64-575 w stężeniu niższym niż aztreonam, dla którego IC_{50} wynosiło $1,6 \times 10^{-3}$ mol/L^{12,13}.

W wyniku przeprowadzonych przez mnie badań właściwości inhibitorowych obydwu grup klawamów w kierunku hamowania aktywności β -laktamazy klasy A wykazałam, że IC_{50} wynosiło od $8,8 \times 10^{-3}$ do $8,0 \times 10^{-2}$ mol/L, oprócz związków (32) i (33), które nie były aktywne. Badane klawamy w porównaniu do stosowanych w leczeniu kwasu klawulanowego i tazobaktamu hamowały aktywność β -laktamazy klasy A w stężeniach znacznie wyższych (ok. 10^5 razy)²³.

Wszystkie testowane klawamy nie były rozpuszczalne w wodzie, dlatego testy enzymatyczne przeprowadzałam w 25 % metanolu. Na stosunkowo niską aktywność badanych związków z obydwu grup być może wpływał brak grupy karboksylowej w pozycji C-2, a także należałoby rozważyć zmianę podstawników w pozycji C-3

²³ Tzouveleakis L.S., Gazouli M., Prinarakis E. E., Tzelepi E., Legaris N.J.: Comparative evaluation of the inhibitory activities of the novel penicillanic acid sulfone Ro 48-1220 against β -lactamases that belong to groups 1, 2b, and 2be. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 41, 475-477 (1997).

cząsteczki klawamu. Niesprzyjającym czynnikiem w aspekcie aktywności biologicznej był także brak rozpuszczalności związków w środowisku wodnym. Udowodniłam, że spośród przebadanej przez mnie grupy ośmiu klawamów, (3*R*,5*R*) 3-fenylo-klawam (30) wykazuje najwyższą aktywność biologiczną i jego właściwości hamowania aktywności DD-peptydazy 64-575 jako jednego z białek PBP są porównywalne do aztreonamu stosowanego w leczeniu. Omawiany wynik wskazuje chemikom kierunek dalszych modyfikacji cząsteczek w celu podwyższenia ich aktywności biologicznej.

Publikacja [6]

W ramach omawianej pracy przeprowadziłam badania biologiczne, inhibicji DD-peptydazy 64-575, β -laktamazy klasy A oraz badania mikrobiologiczne kolejnej grupy dziesięciu związków klawamowych o różnej konfiguracji [związki (29)-(34), (29ent), (30ent), (32ent), (34ent)], które otrzymano na drodze syntezy w IChO PAN.

Klawam (29) o konfiguracji (*S*) przy węglu C-5 oraz klawam (32ent) o konfiguracji (*R*) przy węglu C-5 wykazywały inhibicję DD-peptydazy 64-575, która wynosiła odpowiednio, $IC_{50} = 3,4 \times 10^{-3}$ mol/L i $IC_{50} = 1,3 \times 10^{-3}$ mol/L. Dla porównania 50 % inhibicję enzymu 64-575 wykazały cefsulodyna, penicylina G i kwas klawulanowy przy niższych stężeniach, odpowiednio: $IC_{50} = 4,5 \times 10^{-4}$ mol/L, $IC_{50} = 6,1 \times 10^{-7}$ mol/L oraz $IC_{50} = 2,0 \times 10^{-5}$ mol/L^{12,13}. Natomiast klawam (32ent) hamował aktywność DD-peptydazy 64-575 w stężeniu porównywalnym do aztreonamu, dla którego IC_{50} wynosiło $1,6 \times 10^{-3}$ mol/L¹³. Pozostałe klawamy wykazywały inhibicję DD-peptydazy 64-575, IC_{50} w zakresie od $4,5 \times 10^{-3}$ do 3×10^{-2} mol/L, oprócz związku (33ent), który nie hamował aktywności enzymu. Badane klawamy wykazywały umiarkowaną aktywność inhibicji DD-peptydazy 64-575. Ponadto, klawam (32ent) hamował aktywność β -laktamazy klasy A, wyrażoną wartością IC_{50} wynoszącą $1,9 \times 10^{-3}$ mol/L.

Zsyntetyzowane związki zbadalam w kierunku aktywności przeciwgrzybiczej metodą krążkowo-dyfuzyjną przy użyciu szczepu referencyjnego *Candida albicans* ATCC 90028. Klawamy (29), (29ent), (32), (32ent) i (34) wykazywały strefy zahamowania wzrostu szczepu odpowiednio: 14, 15, 15, 15 oraz 12 mm, przy czym

związki (29), (29ent) i (34) były наносzone na krążki w ilości 200 µg, a klawamy (32) i (32ent) w ilości 50 µg.

Klawamy (29) i (32ent) testowałam również w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej, stosując referencyjny szczep *Escherichia coli* ATCC 25922, wykazując brak aktywności obydwu związków.

Udowodniłam, że spośród przebadanej przez mnie grupy dziesięciu klawamów, (3*S*,5*R*) 3-furylo-klawam (32ent) wykazywał najwyższą aktywność biologiczną i jego właściwości inhibicji DD-peptydazy 64-575 są porównywalne, do niektórych β-laktamów stosowanych w leczeniu. Ponadto jest inhibitorem β-laktamazy klasy A oraz hamuje wzrost drożdży *C. albicans*. Omawiany wynik wskazuje chemikom syntetykom kierunek kolejnych modyfikacji cząsteczek w celu podwyższenia ich aktywności. Dalsze eksperymenty mające na celu wprowadzenie (racjonalnych) zmian struktury badanych klawamów mogą doprowadzić do otrzymania związków o dużej aktywności przeciwbakteryjnej i / lub przeciwgrzybiczej.

Publikacja [7]

Ponadto przeprowadziłam badania zdolności hamowania aktywności DD-peptydazy 64-575 serii siedmiu związków tricyklicznych z układem β-laktamowym zsyntetyzowanych w IChO PAN. Tylko trzy z nich wykazywały 20-30 % zahamowanie aktywności DD-peptydazy 64-575 w stężeniach 10⁻³ mol/L. Nie zaobserwowano znaczącej różnicy poziomu aktywności między testowanymi związkami, dlatego nie podjęto prób określenia relacji struktura cząsteczki – aktywność (SAR).

Publikacja [8]

Na związkach posiadających strukturę oksacefamu i oksacefemu, które teoretycznie mogły wykazywać działanie biologiczne, przeprowadziłam testy hamowania aktywności DD-peptydazy 64-575 i β-laktamazy klasy A, nie stwierdzając właściwości inhibicji obydwu enzymów.

Publikacja [9]

Celem pracy była modyfikacja metody oznaczania inhibicji DD-peptydazy 64-575 do badań hamowania aktywności przez syntetyczne, nierozpuszczalne w wodzie związki β -laktamowe. Testom poddałam osiem oksacefamów (I-VI, XI, XII) oraz cztery klawamy (VII-X) otrzymane w IChO PAN. 25 % roztwór metanolu był środowiskiem optymalnym do pomiarów inhibicji DD-peptydazy 64-575 przez nierozpuszczalne w wodzie badane β -laktamy. Oksacefam (I) i (III) hamowały aktywność DD-peptydazy 64-575 w stężeniach 10^{-4} - 10^{-7} mol/L. Pozostałe oksacefamy i klawamy wykazywały inhibicję DD-peptydazy 64-575 w stężeniach bardzo wysokich, lub całkowity brak inhibicji. Należy kontynuować prowadzone badania, szczególnie biorąc pod uwagę możliwość modyfikacji cząsteczki β -laktamów w kierunku uzyskania związków o lepszej rozpuszczalności w wodzie oraz o zwiększonej aktywności przeciwbakteryjnej. Związki: (3'S,4'R) 5-deoksy-1,2-O-izopropylideno-3-O:5-C-(3'-metyloazetydyn-2'-on-1',4'-diyl)- α -D-ksylofuranoza (I) oraz (3'R,4'R) 5-deoksy-1,2-O-izopropylideno-3-O:5-C-(3'-trimetylosililoetyloazetydyn-2'-on-1',4'-diyl)- α -D-ksylofuranoza (III) są najbardziej skutecznymi inhibitorami DD-peptydazy 64-575, dlatego wskazane są modyfikacje cząsteczek w celu poprawienia ich właściwości fizykochemicznych.

Publikacja [10]

Przeprowadziłam również testy inhibicji DD-peptydazy 64-575 oraz β -laktamazy klasy A przy użyciu serii pięciu związków monobaktamowych (11a-e) z podstawnikiem 4-arylotio- otrzymanych w IChO PAN.

Spośród zbadanej serii związków monobaktamowych (11a-e) wszystkie wykazywały bardzo niską inhibicję aktywności DD-peptydazy 64-575 oraz brak inhibicji β -laktamazy klasy A, oprócz (4S)-4-(o-tolytio)-azetydyn-2-onu (11b), który hamował aktywność β -laktamazy klasy A (IC_{50} wynosiło $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L). Przedstawiona seria związków monobaktamowych z modyfikowanym podstawnikiem 4-fenylo- stanowi grupę związków o minimalnej aktywności biologicznej, dlatego celowe są modyfikacje chemiczne cząsteczek po uprzednim modelowaniu

molekularnym, w wyniku którego nastąpi lepsze dopasowanie modelowej cząsteczki do miejsca wiążącego, jakim jest ściana komórkowa bakterii.

Krótkie omówienie prac uzupełniających oraz mojej pozostałej działalności naukowej:

Kolejnym aspektem prac badawczych, które realizowałam we współpracy z IChO PAN, w ramach wspólnych grantów MNiSW, NCBiR oraz Sieci Naukowej było poszukiwanie nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym z wykorzystaniem dendrymerów. Są to peptydy o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego. Intensywne badania ostatnich lat nad syntezą i własnościami biologicznymi analogów tych peptydów pozwoliły znaleźć pochodne o interesujących własnościach. Uważa się, że mogą one stanowić potencjalne źródło nowych chemioterapeutyków. Z mojej strony współpraca obejmowała badania biologiczne 3 grup związków dendrymerycznych:

- peptydowe dendrymery przeciwdrobnoustrojowe, o strukturach ogólnych: Z-Lys(HCl)-Lys[Z-Lys(HCl)]PheCONHR oraz (HCl)Lys-(Z)-[Lys-(HCl)-Lys-Z]-PheCONHR, w których na C-końcu umieszczono lipofilowe reszty, gdzie $R = (CH_2)_nCH_3$, $n = 7, 9, 11$,
- grupę dendrymerów opartych o nowego typu rdzenie pochodzenia aminokwasowego o strukturze bardziej rozgałęzionej,
- grupę peptydowych dendrymerów zaprojektowanych tak aby zawierały układ benzylopenicyliny i dedykowanych jako inhibitory DD-karboksypeptydaz.

Dla wszystkich grup związków wykonałam badania mikrobiologiczne na kilkunastu wzorcowych szczepach bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Badania mikrobiologiczne wykazały, że wprowadzone modyfikacje strukturalne pozwoliły na otrzymanie związków o aktywnościach znacząco wyższych. Ponadto, w porównaniu do poprzednich analogów, związki te wykazały wysokie aktywności wobec klinicznych szczepów wielolekoopornych. Po raz pierwszy stwierdzono dla

związków dendrymerycznych znaczącą aktywność wobec grzybów *Candida albicans*. Dodatkowo dendrymery wykazujące najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową zbadałam w kierunku właściwości hemolitycznych. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch pracach uzupełniających oraz zabezpieczono je zgłoszeniem patentowym (tabela II A, poz. 4, 8; tabela II B, poz. 5).

Kolejnym obszarem moich zainteresowań jest poszukiwanie związków wykazujących hamowanie aktywności enzymów z grupy glikozydaz (α -D-glikozydazy, β -D-glikozydazy, β -D-galaktozydazy, β -D-glukuronidazy, α -D-mannozydazy, α -L-fukozydazy). Związki o tej aktywności znalazły zastosowanie jako leki o działaniu przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym oraz obniżającym poziom glukozy we krwi. Tak szerokie zastosowanie w medycynie inhibitorów glikozydaz skłania do poszukiwania kolejnych, nowych związków o szerokim spektrum działania biologicznego. Znanych jest wiele mimetyków cukrów, które są rozpoznawane przez glikozydazy lub glikozylotransferazy, ale nie ulegają charakterystycznym dla cukrów reakcjom przebiegającym na centrum anomerycznym, wykazując właściwości inhibicji tych enzymów. Szczególnie duże nadzieje terapeutyczne pokłada się w iminocukrach lub karbacukrach. Niektóre z nich jak N-butylo-nojirimycyna, która została wprowadzona do leczenia, jest inhibitorem α -D-glikozydazy i hamuje przerzuty nowotworowe. Inne, choć charakteryzują się wysoką aktywnością tak jak kastanospermina są toksyczne. Znane są także związki np. moranolina o aktywności inhibicji glikozydaz, która obniża poziomu glukozy we krwi. Dlatego od wielu lat łączy się wysiłki badawcze chemików i biochemików w celu poszukiwania nowych struktur o lepszych właściwościach terapeutycznych (związki o aktywności inhibicji glikozydaz często wykazują aktywność hamowania przerzutów nowotworowych). W ramach działalności naukowej badałam hamowanie aktywności glikozydaz przez imino- i karbacukry otrzymane na drodze syntezy w IChO PAN. Uzyskałam różny stopień inhibicji glikozydaz (α -D-glikozydazy, β -D-glikozydazy, β -D-galaktozydazy, β -D-glukuronidazy, α -D-mannozydazy, α -L-fukozydazy). Wyniki badań zostały przedstawione w ośmiu publikacjach uzupełniających (tabela II A, poz. 5-7 oraz 9-13).

We współpracy z Pracownią Chemii Związków Naturalnych, Wydziału Chemii UW realizuję również badania biologiczne związków imidowych pochodnych kwasu glutarowego i bursztynowego z różnymi podstawnikami w pierścieniu oraz ich modyfikacjami za pomocą odczynnika Lawesson (LR) do mono- oraz ditioimidów. Ugrupowanie amidowe, jak i związki zawierające w swojej strukturze pierścień piperidynowy bądź pirolidynowy stanowią źródło ciągłego zainteresowania ze względu na ich duże znaczenie biologiczne. Przeprowadziłam kompleksowe badania biologiczne aktywności przeciwbakteryjnej, inhibicji DD-peptydazy 64-575 i β -laktamazy klasy A oraz aktywności hemolitycznej zsyntetyzowanych związków imidowych. Uzyskane wyniki prezentowane były na konferencji naukowej oraz aktualnie przygotowana jest publikacja.

Badania biologiczne prowadzę również we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Zsyntetyzowane związki z grupy β -laktamowej podstawione różnymi układami ferrocenowymi oznaczałam w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej, hemolitycznej oraz inhibicji DD-peptydazy 64-575. Uzyskane wyniki opisano w publikacji (tabela II A, poz. 3).

Kierunek prowadzonych przeze mnie badań wpisuje się we współczesne potrzeby społeczeństwa na całym świecie. Rosnąca oporność bakterii oraz pasożytów, wzrost zachorowalności na nowotwory sprawia, że stale są potrzebne nowe antybiotyki oraz związki biologicznie czynne o nowych strukturach chemicznych. Dlatego obecnie kontynuuję badania kierując projektem „Potencjalny antybiotyk oraz metoda pozyskiwania nowych związków przeciwbakteryjnych”, numer UDA-POIG.01.03.01-14-136 uzyskanym w 2009 r. Grant ten jest realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego (Oś priorytetowa: Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.3: Wsparcie projektów B+R na rzecz przedsiębiorców realizowanych przez jednostki naukowe, Poddziałanie 1.3.1 Projekty Rozwojowe, w grupie tematycznej "Bio- nowe wyroby i techniki medyczne"). Prowadzone do tej pory badania dotyczyły uzyskania na drodze biosyntezy związków wykazujących działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. W chwili obecnej w ramach projektu realizowane są badania

poszerzone o oznaczanie aktywności tych związków w zakresie inhibicji różnych enzymów proteolitycznych, acetylocholinoesterazy, butyrylocholinoesterazy, właściwości przeciwutleniających/przeciwwolnorodnikowych oraz aktywności przeciwnowotworowej (współpraca z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN), aktywności przeciwwirusowych i aktywności przeciwpasożytniczej (współpraca w ramach NIZP-PZH), aktywności przeciwmalarycznej (współpraca z Uniwersytetem Madryckim). Poszerzenie zakresu badań umożliwia mi też nawiązana współpraca z kolejną grupą chemików (Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach) syntetyzujących różne zmodyfikowane związki, których wyjściową, modelową strukturę, stanowi cząsteczka uzyskana na drodze biosyntezy przez szczep *Streptomyces* sp. 8812. Otrzymano już kilkadziesiąt związków, które obecnie są intensywnie badane w kierunku hamowania wyszczególnionych wyżej aktywności biologicznych. Część nieopublikowanych jeszcze wyników w najbliższej przyszłości będzie zabezpieczona zgłoszeniem patentowym.

Ponadto, zgłosiłam udział mojego laboratorium do Europejskiego Programu Przeglądowego: EuOpenscreen w ramach którego będziemy badać aktywności przeciwdrobnoustrojowe związków zgromadzonych w europejskich bibliotekach związków chemicznych. Należymy do tzw. Laboratoriów „Profiling Site”. Program rozpocznie działania praktyczne w 2014 r. Obecnie jest w fazie uregulowań prawnych.

Nadal prowadzę prace z zakresu poszukiwania aktywnych biologicznie metabolitów drobnoustrojów phylum XXVI *Actinobacteria*, klasy I *Actinobacteria* z różnych światowych kolekcji mikroorganizmów oraz szczepów współcześnie izolowanych z różnych miejsc na Ziemi (prywatne kontakty z podróżnikami).

Planuję także poszerzenie warsztatu badawczego o metody modelowania molekularnego, gdyż wyniki obliczeń matematycznych zwiększają szanse na celowaną syntezę chemiczną, w kierunku cząsteczek wykazujących określoną aktywność biologiczną. Takie podejście wpisuje się we współczesne kierunki badawcze.

Odkrycie związków o bardzo wysokiej aktywności biologicznej, a jednocześnie bezpiecznych dla ssaków jest wynikiem olbrzymich wysiłków kooperujących ze sobą ośrodków o różnych profilach badawczych, z obszarów nauk medycznych, chemicznych i innych.

Podsumowując moje dotychczasowe doświadczenia i wyniki przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że droga prowadząca do otrzymania nowych związków, potencjalnych leków, wymaga badania tysięcy różnych substancji. Prowadzone przeze mnie badania poszerzają wiedzę podstawową o naturze związków chemicznych, co pozwala wyznaczać kierunki przyszłych prac badawczych.

