

Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Autoreferat
– podsumowanie osiągnięć naukowych

Barbara Bednarczyk-Cwynar

Poznań 2018

1. Imię i Nazwisko: Barbara Bednarczyk-Cwynar

2. Dyplomy i stopnie naukowe:

- **2007: Dyplom doktora nauk farmaceutycznych.** Tytuł rozprawy: „Synteza laktamów i tiolaktamów pochodnych kwasu oleanolowego będących aktywatorami transportu przezskórnego”. Praca zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik: dr hab. prof. Lucjusza Zaprutko. Praca nagrodzona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu;
- **1996: Dyplom magistra chemii.** Tytuł rozprawy: „Badania nad otrzymywaniem etylenu z metanu metodą utleniającej dimeryzacji”. Praca zrealizowana w Zakładzie Technologii Chemicznej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie, kierownik: dr hab. prof. Andrzej Machocki;
- **1994: Dyplom licencjata chemii.** Tytuł rozprawy: „Freony. Właściwości, zastosowanie, konsekwencje klimatyczne”. Praca zrealizowana w Zakładzie Technologii Chemicznej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie, kierownik: dr hab. prof. Andrzej Machocki;

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **od 2012:** Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, adiunkt
- **2007 – 2011:** Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, asystent z doktoratem
- **1997 – 2007:** Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, asystent
- **1996 – 1997:** Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie, Wydział Chemii, Zakład Chemii Organicznej, asystent

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego*

wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Acyloksyiminowe pochodne kwasu oleanolowego – synteza, właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne”

Podstawę ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego stanowi **siedmiu** prac, powiązanych tematycznie (sześciu oryginalnych publikacji naukowych, jednej pracy przeglądowej) oraz patentu, opublikowanych w latach **2011 – 2018**. Przedstawiono w nich wyniki badań dotyczących opracowania metody syntezy O-acylowych pochodnych oksymów kwasu oleanolowego, oceny ich aktywności przeciwnowotworowej, przeciwbólowej i przeciwzapalnej oraz analizę zależności pomiędzy budową związków a poziomem ich aktywności farmakologicznej.

b) Wykaz publikacji reprezentujących osiągnięcie naukowe, wynikające z art. 16, ust. 2, ustawy o stopniach akademickich:

Oдноśniki do prac z cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe oznaczone zostały literą **H**. Dla wszystkich prezentowanych prac, których jestem współautorem, podano wartości wskaźnika *Impact Factor* czasopism, w których się ukazały (według Journal Citation Reports), zgodnie z rokiem opublikowania. Dla jednej publikacji, która została opublikowana w 2018 roku podano wartości IF za rok 2017. Dla każdej publikacji podano również liczbę punktów przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

H.1. Barbara Bednarczyk-Cwynar (✉), Lucjusz Zaprutko, Piotr Ruszkowski, Bogusław Hładoń, Anti-cancer effect of A-ring or/and C-ring modified oleanolic acid derivatives on KB, MCF-7 and HeLa cell lines, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, 10, 2201 – 2205.

IF = 3.568

KBN/MNiSW = 35.000

H.2. Danyło Kaminsky, **Barbara Bednarczyk-Cwynar**, Olexandr Vasylenko, Oxana Kazakova, Borys Zimenkovsky, Lucjusz Zaprutko, Roman Lesyk, Synthesis of new potential anticancer agents based on 4-azolidinone and oleanane scaffolds, *Med. Chem. Res.*, 2012, 21, 3568 – 3580.

IF = 1.612

KBN/MNiSW = 15.000

H.3. **Barbara Bednarczyk-Cwynar** (✉), Piotr Ruszkowski, Dmytro Atamanyuk, Roman Lesyk, Lucjusz Zaprutko, Hybrids of oleanolic acid with norbornene-2,3-dicarboximide-N-carboxylic acids as potential anticancer agents. *Acta Pol. Pharm.*, 2017, 74, 827 – 835.

IF = 0.745

KBN/MNiSW = 15.000

H.4. **Barbara Bednarczyk-Cwynar** (✉), Lucjusz Zaprutko, Recent advances in synthesis and biological activity of triterpenic acylated oximes, *Phytochem. Rev.*, 2015, 14, 203 – 231.

IF = 2.686

KBN/MNiSW = 40.000

H.5. **Barbara Bednarczyk-Cwynar**, Piotr Ruszkowski, Tomasz Jarosz, Katarzyna Krukiewicz, Enhancing anticancer activity through the combination of bioreducing agents and triterpenes, *Future Med. Chem.*, 2018, in press, DOI: 10.4155/fmc-2017-0154

IF = 3.556 (2017)

KBN/MNiSW = 40.000 (2017)

H.6. **Barbara Bednarczyk-Cwynar**, Danyło Kaminsky, Dmytro Atamanyuk, Oxana Flekhter, Lucjusz Zaprutko, Roman Lesyk, Nowe O-acylowane oksymy pochodnych kwasu oleanolowego oraz sposób otrzymywania acylowanych oksymów pochodnych kwasu oleanolowego / New O-acylated oximes derivatives of oleanolic acid and the method of obtaining of acylated oximes derivatives of oleanolic acid, Polish Patent nr 217864, 2011r

H.7. B. Bednarczyk-Cwynar (✉), Lucjusz Zaprutko, Joanna Marciniak, Grzegorz Lewandowski, Michał Szulc, Ewa Kamińska, Natalia Wachowiak, Przemysław Ł. Mikołajczak, The Analgesic and Anti-inflammatory Effect of New Oleanolic Acid Acyloxyimino Derivative, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, 47, 549 – 555.

IF = 2.987

KBN/MNiSW = 35.000

H.8. Barbara Bednarczyk-Cwynar (✉), Natalia Wachowiak, Michał Szulc, Ewa Kamińska, Anna Bogacz, Joanna Bartkowiak-Wieczorek, Lucjusz Zaprutko, Przemysław Ł. Mikołajczak, Strong and long-lasting antinociceptive and anti-inflammatory conjugate of naturally occurring oleanolic acid and aspirin, *Front. Pharmacol.*, 2016, 7, e202.

IF = 4.400

KBN/MNiSW = 40.000

Publikacje te oznaczone są w tekście symbolami od **H.1.** do **H.8.**

Łączna punktacja Impact Factor (IF) dla siedmiu prac wynosi: **19.554**

Łączna punktacja KBN/MNiSW dla siedmiu prac wynosi: **220.000**

Oświadczenia Habilitanta dotyczące wykonywanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w Załączniku 4.

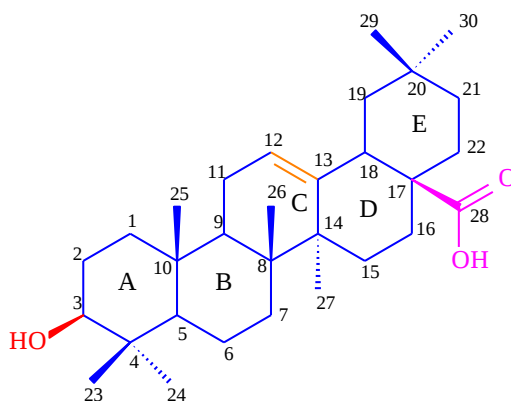
***Oświadczenia Współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5**

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego powyższego Osiągnięcia i uzyskanych wyników i ich ewentualnego wykorzystania.

I. Wprowadzenie oraz cele naukowe badań

Terpenoidy, znane również jako izoprenoidy, stanowią największą grupę (ponad 40 000) związków pochodzenia naturalnego, obecnych głównie w licznych roślinach jadalnych i leczniczych [1]. Największą i najważniejszą grupę w obrębie terpenoidów reprezentują triterpenoidy. Związki te, posiadające podstawowy szkielet zbudowany z 30 atomów węgla, podzielono na 23 podgrupy, w zależności od budowy struktury podstawowej. Do najważniejszych należą oleanany (kwas oleanolowy, glicyretynowy, α -boswelinowy, arjunolowy, maslinowy), ursany (kwas ursolowy, azjatykowy, korozolowy, β -boswelinowy, pomolowy) oraz lupany (lupeol, betulina, kwas betulinowy). Od lat związki te przyciągały wiele uwagi naukowców, ze względu na ich różnorodne właściwości farmakologiczne oraz liczne możliwości chemicznych modyfikacji, prowadzących do nowych pochodnych, o wyższym poziomie znanej aktywności farmakologicznej lub o nowym kierunku działania biologicznego.

Najbardziej popularnym triterpenem z grupy oleananu jest kwas oleanolowy (OA, **Rys. 1**). Jego szkielet składa się z pięciu sześciocząłowych pierścieni, jak to przedstawiono na **Rys. 1**, i siedmiu grup metylowych, umiejscowionych przy atomie C-4, C-20 (dwie grupy CH₃ w każdej pozycji), C-8, C-10 i C-14 (jedna grupa CH₃ w każdej pozycji). Ponadto w strukturze OA znajduje się grupa hydroksylowa i karboksylowa, w pozycjach, odpowiednio, C-3 i C-17 oraz podwójne wiązanie pomiędzy atomem C-12 oraz C-13.



Rys. 1. Struktura kwasu oleanolowego (1).

Powyższy triterpen obecny jest w ponad 1600 roślin [2]. Wynikiem rosnącego zainteresowania powyższym związkiem są nowe eksperymenty chemiczne i farmakologiczne. Liczne badania biologiczne dotyczące kwasu oleanolowego (**1**) udowodniły m.in. jego aktywność przeciwnowotworową, przeciwcukrzycową, przeciwmikrobową, hepatochronną, przeciwnadciśnieniową, antyoksydacyjną, przeciwzapalną oraz inne [3]. Powyższy triterpen wykazał działanie cytotoksyczne w stosunku do różnych linii komórek nowotworowych, takich jak: MCF-7 (gruczolakorak piersi), DLD-1, SW620 (gruczolakoraki jelita grubego), A549 (rak płuc), SK-OV-3 (rak jajnika), FaDu (rak gardłowo-przełykowy), HeLa (rak nabłonka szyjki macicy) [4,5], HuH7 (rak wątroby) [6], U87MG, U51MG (pierwotne glejaki) [7], A375 (czerniak) [8], MG63, Saos-2 (kostniakomięsaki) [9] i wiele innych.

Nowotwory stanowią olbrzymią grupę chorób obejmujących nieprawidłowy wzrost komórek z możliwością inwazji do innych narządów organizmu. Jest to jedna z najbardziej rozpowszechnionych destrukcyjnych chorób, atakujących corocznie miliony ludzi. Leczenie nowotworów dzieli się na różne grupy, w zależności od jego rodzaju, stopnia wzrostu, wieku pacjenta i innych czynników. Ogólnie rzecz biorąc, nowotwory traktuje się kombinacją różnych metod, takich jak chirurgia, naświetlania, chemioterapia czy immunoterapia. Chemioterapia polega na interferencji leku z procesem podziału komórkowego nowotworu celem opóźnienia rozwoju raka lub nawet cofnięcia procesu karcynogenezy, i ostatecznie do śmierci komórek nowotworowych. Pomimo że obecnie testuje się różnorakie związki chemiczne jako czynniki przeciwnowotworowe, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, wciąż istnieje potrzeba odkrycia nowych związków o działaniu chemoprewencyjnym. Obecnie najbardziej obiecującym źródłem nowych aktywnych związków chemicznych mogących stanowić leki przeciwnowotworowe są rośliny lecznicze. Jak wynika z danych literaturowych, w chemioterapii nowotworów stosuje się różne klasy związków naturalnych, w tym terpenoidy [10], które wykazywały obiecujące efekty zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Kwas oleanolowy (**1**), najbardziej reprezentatywny triterpen o szkielecie oleananu, wykazał aktywność przeciwnowotworową na różnych etapach rozwoju guzów nowotworowych. Liczne badania biologiczne udowodniły różne mechanizmy działania przeciwnowotworowego powyższego triterpenu, w tym inhibicję proliferacji komórek guza, indukowanie apoptozy komórek nowotworu, zapobieganie inwazji i metastazy komórek nowotworowych [11], hamowanie wzrostu komórek raka [12], hamowanie angiogenezy [13], indukowanie autofagii [14] i inne. Wszystkie powyższe mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej zostały określone jednakże tylko dla niewielkiej liczby linii komórek

nowotworowych, stąd prowadzone są dalsze poczynania w kierunku otrzymania kolejnych pochodnych triterpenowych, w tym również pochodnych kwasu oleanolowego, o wyższym poziomie biodostępności i aktywności farmakologicznej. Aktywność ta związana jest z budową podstawowego szkieletu triterpenowego, jak również obecnością przyłączonych grup funkcyjnych, które oferują dalsze możliwości modyfikacji chemicznych, prowadzących do pochodnych bardziej aktywnych. Dla przykładu, pochodna kwasu oleanolowego: kwas 2-cyjano-3,12-dioksooleanan-1,9(11)-dien-28-owy (CDDO, **2a**, Rys. 2) i jego ester metylowy (CDDO-Me, **2b**) w badaniach klinicznych wykazały aktywność przeciwzapalną i przeciwnowotworową 10 000 razy wyższą niż ich związek macierzysty [15].

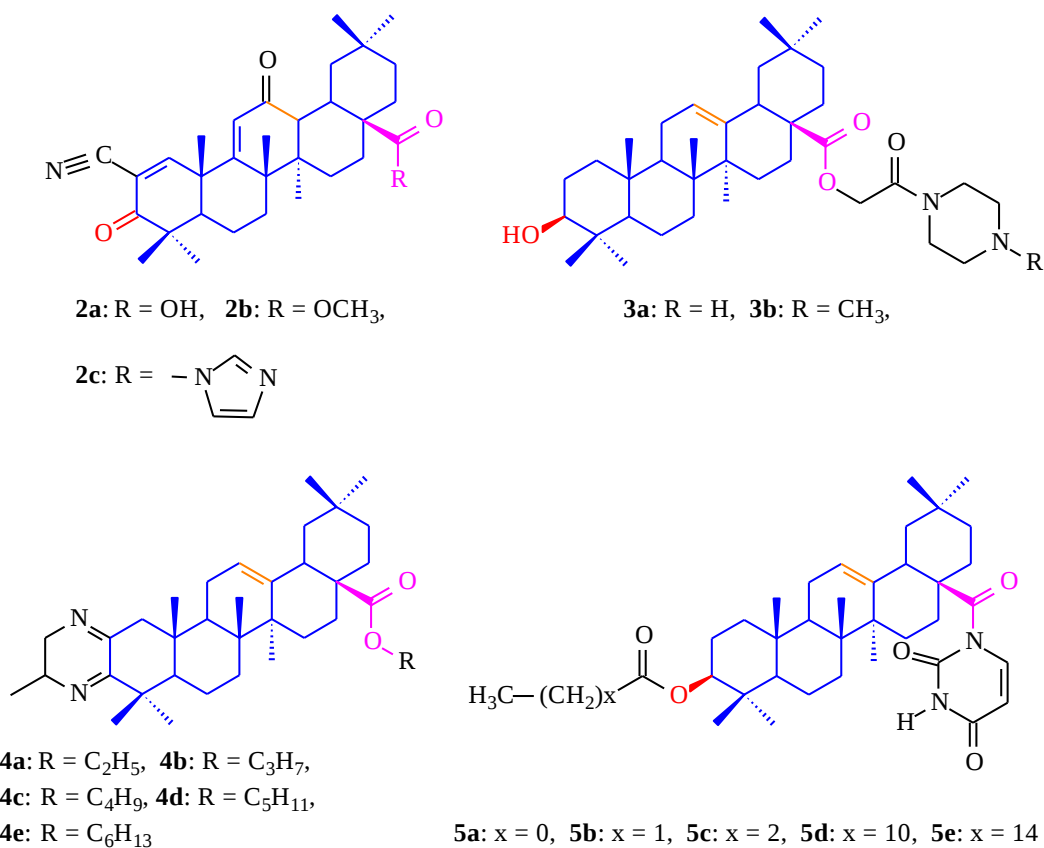


Fig. 2. Przykłady pochodnych kwasu oleanolowego (**2a – c**, **3a**, **3b**, **4a – e**, **5a – e**) o działaniu przeciwnowotworowym, otrzymanych w ostatnich latach.

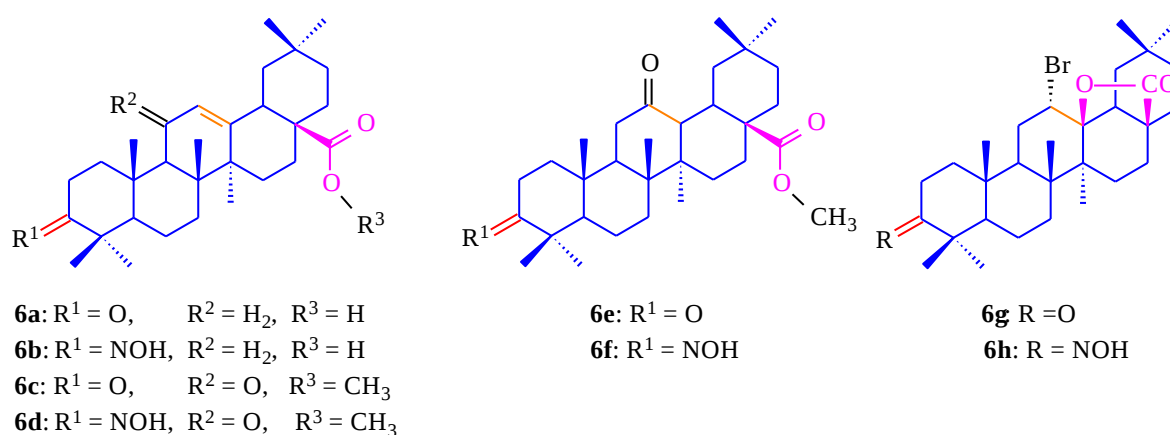
W ostatnich latach opublikowano liczne prace dotyczące nowych pochodnych kwasu oleanolowego i ich aktywności przeciwnowotworowej. Poniżej zaprezentowano tylko kilka przykładów takich związków. Tian i inni otrzymali serię pochodnych OA (**1**) zawierających w cząsteczce atom azotu, otrzymanych przez estryfikację grupy C-17 karboksylowej kwasem

hydroksyoctowym, po której dokonano reakcji tworzenia amidów z aminami lub diaminami, uzyskując pochodne typu **3a** oraz **3b** (**Fig. 2**). Aktywność proliferacyjną otrzymanych pochodnych oceniono w stosunku do linii MCF-7, HeLa oraz A549, z wykorzystaniem metody MTT [16]. Wartości IC_{50} dla tych związków różniły się od 6,29 do ponad 100 μM . Yu i inni otrzymali estry OA z pierścieniem pirazyny, metylopirazyny lub imidazolu, skondensowanym z pierścieniem A triterpenu (związki typu **4a – e**, **Rys. 2**). Wartości IC_{50} dla komórek nowotworowych A549 and SGC-7901 w teście MTT wahały się od 5 do > 50 μM [17]. Z kolei Mo i wsp. otrzymali amidy kwasu oleanolowego z uracylem i z dodatkowo acylowaną grupą C-3 hydroksylową (**5e – e**, **Rys. 2**) i badali je z wykorzystaniem komórek Hep-G2, A549, BGC-823, MCF-7 oraz PC-3. W większości przypadków badane pochodne wykazały wartości IC_{50} poniżej < 10 μM [18].

Dla olbrzymiej większości przypadków syntezy pochodnych kwasu oleanolowego niezbędne jest przeprowadzenie wieloetapowego cyklu reakcji chemicznych. Jednym z celów badań przeprowadzanych w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu było otrzymanie nowych pochodnych kwasu oleanolowego o wysokim poziomie aktywności farmakologicznej, których synteza jednakże nie wymagałaby licznych etapów chemicznych przekształceń, zastosowania skomplikowanych lub drogich odczynników czy czasochłonnego oczyszczania. W 2011 roku Paszel i współautorzy badali proste 3-ketony i 3-oksymy kwasu oleanolowego (**6a – h**, **Rys. 3**), wykorzystując w teście MTT eksperymentalny model zawierający trzy linie ostrej białaczki limfoblastycznej (linia CCRF-CEM i linie o cechach MDR: CCRF-VCR1000 oraz CCRF-ADR5000) [19]. Badane związki miały wolną grupę C-17 karboksylową, przekształconą do postaci estru metylowego lub 28 $\rightarrow$ 13-olidu, a w niektórych przypadkach do cząsteczki triterpenu wprowadzono dodatkową grupę C=O w pozycji C-11 lub C-12. Jak udowodniły otrzymane rezultaty, zastąpienie grupy C-3 hydroksylowej w cząsteczce OA (**1**) ugrupowaniem hydroksyiminowym (=NOH) oraz estryfikacja grupy C-17 karboksylowej prowadziły do związków o wyższym poziomie aktywności przeciwnowotworowej. Dwa z powyższych związków, zupełnie nieaktywnych (biorąc pod uwagę aktywność inhibitującą żywotność komórek), tj. **6e** oraz **6g** (**Rys. 3**) były chemicznie zmodyfikowane w pozycji C-12. Zastąpienie grupy C=O w pozycji C-3 tych związków ugrupowaniem =NOH podniosło aktywność przeciwnowotworową pochodnych **6f** oraz **6h**. Dane te wskazują, że rodzaj grupy funkcyjnej oraz jego lokalizacja ma duży wpływ na aktywność biologiczną triterpenów.

Grupa oksymowa w cząsteczce triterpenu może być dalej poddana reakcji redukcji [e.g. 20], acylowania [e.g. 21] lub przegrupowania Beckmanna [e.g. 22].

Jak wynika z danych piśmiennictwa, pierwsza synteza acylowanych oksymów triterpenowych została przeprowadzona w 1998 r. przez Sun i wsp. dla oksymu ze szkieletem lupanu [21]. Naukowcy ogrzewali mieszaninę dioksyinu betuliny, bezwodnika kwasu 3,3-dimetyloglutarylowego oraz 4-(N,N-dimetyloamin)pirydyny (DMAP) w osuszonej pirydynie przez noc w temp. 95 °C. Po obróbce i oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej żądany O-acylowany oksym otrzymano z wydajnością 59%. W badaniach na aktywność przeciw wirusowi HIV z zastosowaniem ostro zainfekowanych limfocytów H9 wartości IC₅₀ oraz EC₅₀ dla powyższego O-acylowanego oksymu wynosiły, odpowiednio, 15,40 oraz 4,57 µM.



Rys. 3. Pochodne kwasu oleanolowego **6a – h** o aktywności przeciwnowotworowej, z grupą C-3 ketonową lub oksymową.

Wszystkie powyższe fakty prowadzą do hipotezy, że opracowanie prostej, efektywnej metody syntezy O-acylowanych oksymów, nie wymagającej czasochłonnego procesu izolowania i oczyszczania, jak również przeprowadzenie odpowiednio zaplanowanych chemicznych modyfikacji, powinno prowadzić do otrzymania łatwo dostępnych nowych pochodnych z wysokimi wydajnościami i o wysokim poziomie aktywności farmakologicznej. Na bazie tej hipotezy zdecydowano, że opracowanie takiej metody będzie jednym z głównym celów prezentowanego Osiągnięcia. Otrzymane tą metodą pochodne zostaną poddane ocenie ich aktywności farmakologicznej, a jednym z kolejnych celów będzie również ocena zależności pomiędzy strukturą i aktywnością.

Aby tego dokonać, pod uwagę zostaną wzięte następujące różnice w budowie strukturalnej pochodnych triterpenowych: (I) umiejscowienie grupy *O*-acyloksylowej w obrębie cząsteczki triterpenu (w pozycji C-3 lub C-12); (II) rodzaj podstawnika w pozycji C-3 w przypadku oksymów z grupą =NOH w pierścieniu C; (III) rodzaj grupy funkcyjnej w pozycji C-17 triterpenu; (IV) obecność lub brak dodatkowej grupy karbonylowej w położeniu C-11 lub C-12 w przypadku oksymów z grupą =NOH w pierścieniu A, i najważniejszy aspekt: (V) rodzaj grupy acylowej w ugrupowaniu acyloksylowym.

Kluczową rolę w powstawaniu i rozwoju wielu chorób, takich jak choroby nowotworowe, odgrywa stan zapalny. Wiele triterpenów wykazuje obiecujące właściwości przeciwzapalne, co udowodniono w badaniach eksperymentalnych i klinicznych, w większości były to triterpeny z grupy ursanu, oleananu i lupanu.

Oprócz właściwości przeciwzapalnych, kwas oleanolowy wykazuje również działanie przeciwbólowe. Przeprowadzono na tym triterpenie liczne testy, z racji na jego obiecujące działanie przeciwzapalne i udowodniono dla niego różne drogi tej aktywności. Na przykład, w badaniach na ludzkich komórkach śródbłonna naczyniowego (HUVECs) wykazano aktywność przeciwzapalną kwasu oleanolowego poprzez hamowanie uwalniania białka HMBG1, odbywającego się przy udziale liposacharydów (LPS) i ekspresji białka odpowiedzialnego za adhezję (CAMs) [23]. HMGB1 jest białkiem, które podwyższa ekspresję cytokin prozapalnych w ostrych chorobach zapalnych. Lee i inni wykazał, że OA (**1**) w testach *in vitro* oraz *in vivo* obniża prozapalną odpowiedź indukowaną przez LPS przez redukcję ekspresji jądrowego czynnika κ B (NF- κ B) i czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α , dwa biomarkery stanu zapalnego [24]. Z kolei jak wykazał Maia i inni [25], efekt przeciwbólowy kwasu oleanolowego (**1**) jest zależny od zaaplikowanej dawki i związany jest z mechanizmem opioidowym i receptorami waniloidowymi.

Soldi i inni [26] testował niektóre syntetyczne 3-*O*-acyłowe pochodne α - oraz β -amyryny pod kątem ich właściwości przeciwbólowych z wykorzystaniem modelu bólu wywołanego kwasem octowym. Uzyskane wyniki wskazywały na istotne różnice w poziomie aktywności przeciwbólowej pomiędzy otrzymanymi pochodnymi acylowymi, zależne od długości łańcucha 3-*O*-acyłowego. Najbardziej aktywnymi związkami okazały się pochodne: propionylowa, heksanoilowa oraz oktanoilowa, z tą ostatnią jako najbardziej aktywną. Powyższe triterpeny były znacznie bardziej aktywne niż kwas acetylosalicylowy i morfina, użyte jako substancje standardowe. Powyższe wyniki zachęciły do otrzymania nowej

poходnej kwasu oleanolowego z ugrupowaniem acyloksyiminowym w pozycji C-3, w którym to ugrupowaniu reszta acylowa zawierałaby osiem atomów węgla.

Jak wiadomo od wielu lat, koniugat kwasu salicylowego z morfoliną jest dobrze znanym czynnikiem przeciwzapalnym [27]. Ester acetylowy powyższego kwasu, znany jako aspiryna, jest z kolei bardzo popularnym lekiem stosowanym w leczeniu bólu, gorączki i stanów zapalnych. Te fakty zainspirowały do otrzymania pochodnej triterpenowej z trzema elementami budowy, które mogą być odpowiedzialne za wysoki poziom aktywności przeciwzapalnej: (I) wiązanie podwójne pomiędzy atomem C-3 i atomem azotu ($-N=C<$); resztę kwasu acetylosalicylowego przyłączoną do powyższej grupy $-N=C<$ oraz (III) pierścien morfolinowy zamiast grupy hydroksylowej znajdującej się w obrębie grupy $-COOH$.

Kolejnymi celami prezentowanego Osiągnięcia stała się zatem synteza powyżej zaprojektowanych O-acylowych oksymów kwasu oleanolowego oraz ocena ich aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej na modelu zwierzęcym.

II. Omówienie osiągnięć naukowych

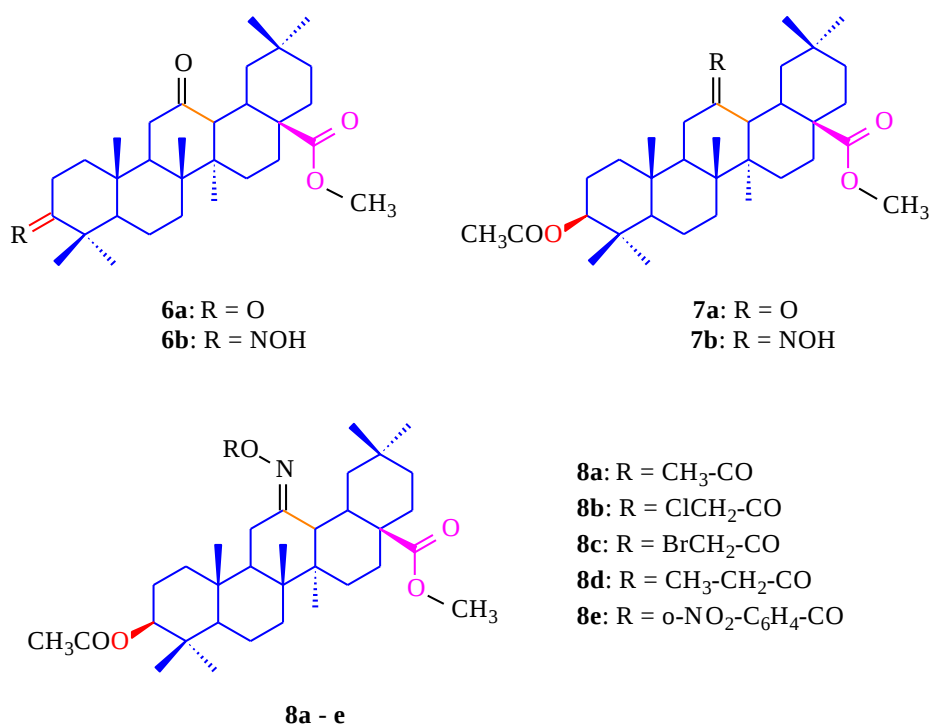
II. 1. Opracowanie metody syntezy O-acylowania oksymów kwasu oleanolowego. Ocena aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych pochodnych w testach *in vivo*

Jak już zaprezentowano wcześniej [19], obecność ugrupowania hydroksyiminowego ($=NOH$), a w szczególności podgrupy $=N=O-$ w pozycji C-3 szkieletu triterpenu ma największy wpływ aktywność przeciwnowotworową pochodnych kwasu oleanolowego. Pierwsza publikacja, która jest częścią prezentowanego Osiągnięcia, opublikowana w ***Organic and Biomolecular Chemistry* (H.1)**, prezentuje nową metodę syntezy niektórych pochodnych kwasu oleanolowego (**1**) oraz wpływ rodzaju i lokalizacji różnych podstawników, które zostały wprowadzone do cząsteczki kwasu oleanolowego, na aktywność przeciwnowotworową nowych substancji. Celem zbadania powyższej zależności ester metylowy kwasu oleanolowego utleniano odczynnikami Jonesa lub acylowano we wrzącym bezwodniku octowym. Obydwa związki utleniano następnie kwasem *m*-chloronadbenzoesowym (*m*-CPBA), otrzymując, odpowiednio, 3,12-diketon (**6a**, **Rys. 4**) lub 3-acetoksy-12-keton (**7a**). Jak wiadomo z piśmiennictwa, wiązanie podwójne w pomiędzy atomami C-12 oraz C-13 w cząsteczce acetylooleanolanu metylu może być utleniane *m*-CPBA w chlorku metylenu w temperaturze pokojowej, w wyniku czego, jako główny

produkt, powstaje związek z grupą ketonową w pozycji C-12 [28]. Podobne utlenianie C-3 ketopochodnej triterpenowej z zastosowaniem *m*-CPBA w obecności Li_2CO_3 jest znane jako utlenianie Bayera-Villigera [29] i prowadzi do związku z rozszerzonym pierścieniem A, zawierającym dodatkowy atom tlenu (ϵ -laktonowy pierścień A), ale z niezmiennym wiązaniem podwójnym C-12–C-13. Jak udowodniły dane spektralne, utlenianie 3-ketooleanolanu metylu *m*-CPBA bez dodatku węglanu litu czy innych dodatkowych reagentów, prowadzi do diketonu **6a** (Rys 4), z niezmiennym pierścieniem A.

Produkt reakcji 3-oksooleanolanu metylu z *m*-CPBA oczyszczano na kolumnie żelu krzemionkowego. Pozwoliło to wyeliminować konieczność użycia dodatkowych odczynników celem przekształcenia epoksydu powstałego po reakcji z nadkwasem w 12-keton. W powyższym procesie oczyszczania na kolumnie chromatograficznej, żel krzemionkowy odgrywał rolę katalizatora kwasowego, dzięki któremu zaszło otwarcie pierścienia epoksydowego w produkcie przejściowym. Odpowiedni 3,12-diketon **6a** (Rys. 4) otrzymano z wydajnością powyżej 80% (H.1).

Diketon **6a** otrzymano również z monoketonu **7a**, po alkalicznej hydrolizie tego drugiego i dalszym utlenianiu powstałego produktu odczynnikami Jonesa.



Rys. 4. Pochodne kwasu oleanolowego **6a**, **6b**, **7a**, **7b**, **8a – e** o aktywności przeciwnowotworowej, zawierające grupę ketonową, hydroksyiminową lub acyloksyiminową w pozycji C-3 lub C-12.

Powyższe ketony, odpowiednio, **6a** oraz **7a**, poddano reakcji z chlorowodorkiem hydroksyloaminy we wrzącym etanolu, na bazie procedury stosowanej do syntezy oksymów w pozycji C-3. Jak wynika z danych spektralnych, jedyną grupą w obrębie cząsteczki diketonu **6a**, która uległa reakcji z powyższym odczynnikiem okazała się być grupa C-3 ketonowa, otrzymano zatem, jako jedyny produkt tej reakcji, pochodną o charakterze 3-oksymu-12-ketonu, dotychczas nieznaną w chemii triterpenów. Monoketon **7a** tworzył odpowiedni C-12 monooksym **7b** (**Rys. 4**).

Jak udowodniły nasze wcześniejsze eksperymenty [19], obecność grupy ketonowej w pozycji C-12 obniża aktywność przeciwnowotworową otrzymanej pochodnej kwasu oleanolowego. Zdecydowano zatem wykorzystać do reakcji acylowania tylko oksym **7b**; jest to prosta chemiczna modyfikacja, która może podwyższyć aktywność farmakologiczną tak otrzymanych nowych pochodnych.

Znane są różne metody acylowania oksymów triterpenowych. Dla przykładu, Sun i wsp. acylował dioksym betuliny bezwodnikami kwasów karboksylowych we wrzącej pirydynie w obecności 4-(N,N-dimetyloamino)pirydyny (DMAP) [21]. Ma i wsp. ogrzewał we wrzącym THF oksymy kwasu oleanolowego z chlorkami kwasów karboksylowych bez dodatku innych reagentów, lub, w innych reakcjach, mieszał powyższe oksymy z kwasami karboksylowymi i N,N'-dicykloheksylokarbodiimidem (DCC) w THF w temperaturze pokojowej [30]. Flekhter *et al.* acylowała oksymy lupanów bezwodnikami kwasów karboksylowych w benzenie [31]. Z kolei Mukherjee i in. mieszał oksym kwasu betulonowego z chlorkiem acetylu lub chlorkiem kwasu *p*-toluenosulfonowego w DMF [32]. Hu *et al.* mieszał oksymy kwasu oleanolowego z bezwodnikiem octowym w pirydynie w temperaturze pokojowej w obecności DMAP [33]. Genet *et al.* ogrzewał oksym kwasu betulonowego i bezwodniki kwasów karboksylowych w pirydynie [34].

Pomimo faktu, że wydajności takich reakcji acylowania oksymów były satysfakcjonujące (50 – 8%), jednakże przeprowadzanie takich transformacji chemicznych wymagało zastosowanie toksycznych rozpuszczalników (pirydyna, benzen), niebezpiecznych czynników acylujących (chlorki kwasów karboksylowych) oraz skomplikowanego procesu oczyszczania z zastosowaniem różnych rodzajów chromatografii kolumnowej (chromatografia kolumnowa na żelu krzemionkowym, RP-18, ODS, HPTLC), a w wielu przypadkach proces oczyszczania na kolumnie żelu krzemionkowego musiał być powtórzony

lub połączony z innym rodzajem chromatografii, np. chromatografia kolumnowa na żelu krzemionkowym oraz chromatografia RP-18 [32].

Wstępne badania przeprowadzone z zastosowaniem różnych rozpuszczalników (np. dioksan, THF, DMF, CH₂Cl₂, CHCl₃) wskazał na dioksan, jako najbardziej korzystny. Najwyższe wydajności, przy jednoczesnym najwyższym stopniu czystości uzyskanego produktu, otrzymano podczas acylowania oksymów triterpenowych stosując kwasy karboksylowe w obecności DCC bez ogrzewania. N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) jest znanym czynnikiem kondensującym, którego głównym zastosowaniem jest reakcja aminokwasów w syntezie peptydów. Ponieważ jest dobrze rozpuszczalny w dioksanie, THF, DMF i wielu innych rozpuszczalnikach organicznych, może być wygodnie zastosowany do połączenia oksymów triterpenowych z cząsteczkami kwasów karboksylowych. W takiej reakcji cząsteczka kwasu karboksylowego tworzy z cząsteczką DCC łatwo odszczepiającą się grupę, która może zostać zastąpiona przez cząsteczkę aminy (lub oksymu) podczas substytucji nukleofilowej. Produkt uboczny, dicykloheksylo-mocznik, jest nierozpuszczalny w rozpuszczalniku użytym do reakcji acylowania, toteż może być łatwo odsączony. Eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem różnych proporcji molowych oksymu, kwasu karboksylowego i DCC wskazały, że najbardziej korzystne proporcje, zarówno pod względem chemicznym jak i ekonomicznym, wynoszą, odpowiednio: 1,0 : 1,2 : 1,5.

Nowa procedura acylowania oksymów triterpenowych obejmuje mieszanie reagentów w temperaturze pokojowej w dioksanie, lub, czasami, w THF lub DMF (w zależności od rozpuszczalności kwasu karboksylowego) do momentu całkowitego przereagowania substratu triterpenowego (kontrola TLC), oddzielenie produktu ubocznego (odsączenie), wylanie otrzymanego przesączu do około 5-krotnej objętości wody, lekko zakwaszonej HCl, odsączenie otrzymanego osadu (lub, w niektórych przypadkach, ekstrakcja, jeśli osad nie ulegał wyraźnemu upostaciowaniu), wysuszeniu i krystalizacji lub ponownemu wytrąceniu jeśli krystalizacja zawiodła. Jako czynniki acylujące zastosowano różne alifatyczne i aromatyczne kwasy karboksylowe.

Spośród pochodnych kwasu oleanolowego otrzymanych w publikacji **H.1**, dwa znane związki: diketon **6a** i monoketon **7a** (**Rys. 4**), jak również siedem nowych pochodnych: dwa oksymy (3-oksym-12-keton **6b**, 12-monooksym **7b**) i pięć acylowanych 12-monooksymów (**8a – e**) poddano testom na aktywność przeciwnowotworową z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych KB, MCF-7 oraz HeLa i testu z sulforodaminą B (SRB). Jak wiadomo z danych piśmiennictwa [32], wprowadzenie grupy propionoksylowej do cząsteczki triterpenu

może podwyższyć aktywność farmakologiczną nowej pochodnej, stąd też spodziewano się, że pochodna **8d**, z ugrupowaniem propionoksyiminowym w pozycji C-12 będzie najbardziej aktywna, w stosunku do badanych linii nowotworowych.

Wartość IC_{50} uzyskana dla kwasu oleanolowego (**1**) dla linii komórek nowotworowych KB, MCF-7 oraz HeLa wynosiła, odpowiednio, 14,93, 13,95 oraz 11,82 μM , (**H.1**). Z kolei wartości IC_{50} dla badanych pochodnych powyższego kwasu (**1**), tj. dla związków **6a**, **6b**, **7a**, **7b** i **8a** – **8e** (**Rys. 4**) wahały się od 0,72 do 10,10 μM dla linii KB (za wyjątkiem związku **8a**), od 1,60 do 11,27 μM (oprócz związków **6a**, **7a** i **8a**) dla linii MCF-7 oraz od 1,34 do 9,84 μM (znów oprócz pochodnej **8a**) dla linii HeLa. Analiza struktury chemicznej badanych związków oraz poziomu ich aktywności wykazała wyraźną zależność. Ketony: **6a** (z dodatkowym ugrupowaniem C-3 ketonowym) oraz **7a** (z grupą acetoksyłową w tej samej pozycji C-3) były umiarkowanie aktywne, wartość IC_{50} przekroczyła 15,00 μM . Powyższe dane potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że obecność grupy ketonowej w pozycji C-12 cząsteczki pochodnych kwasu oleanolowego istotnie obniża poziom aktywności przeciwnowotworowej. Oksymy: **6b** i **7b** były około 6 – 9-razy bardziej aktywne w stosunku do badanych linii komórek nowotworowych niż macierzysty związek, kwas oleanolowy (**1**) (**H.1**). Dane te wskazują z dużym prawdopodobieństwem, że obecność grupy hydroksyiminowej, zarówno w pozycji C-3 jak i C-12, jest odpowiedzialna za wysoki poziom aktywności przeciwnowotworowej triterpenu.

Acyłowany oksym **8a** (**Fig. 4**), z grupą acetoksyiminową w pozycji C-12 i ugrupowaniem acetoksyłowym w pozycji C-3, okazał się nieaktywny, wartość IC_{50} dla tego związku przekraczała 15,00 μM . Oznacza to, że grupa C-12 acetoksyłowa jest elementem strukturalnym osłabiającym aktywność przeciwnowotworową triterpenu.

Cząsteczki nowych produktów **8b** – **8e**, z grupą C-3 acetoksyłową, zmodyfikowano poprzez wprowadzenie grupy halogenoacetoksyłowej (**8b**, **8c**), propionoksyłowej (**8d**) lub *o*-nitrobenzoiłoksyłowej (**8e**) zamiast grupy hydroksylowej w obrębie ugrupowania hydroksyiminowego. Wszystkie otrzymane w ten sposób związki były istotnie bardziej aktywne w stosunku do badanych linii komórek nowotworowych, w porównaniu z macierzystym kwasem oleanolowym (**1**). Pochodna **8b**, z grupą chloroacetoksyłową w położeniu C-12, była około 1.3 – 1.6 razy bardziej aktywna niż macierzysty triterpen (**1**) w stosunku do badanych linii komórkowych, z wartościami IC_{50} w zakresie 7,26 – 9,42 μM , związek **8c**, z ugrupowaniem bromoacetoksyłowym w tej samej pozycji C-12, był nawet 3 – 4 razy bardziej aktywny niż OA (**1**), wartości IC_{50} wahały się od 3,76 do 4,90 μM , natomiast

pochodna **8e**, z układem *o*-nitrobenzoiloksyiminowym, była około 1,5 raza bardziej aktywna niż macierzysty kwas oleanolowy (**1**) w stosunku do komórek KB, MCF-7 oraz HeLa (IC₅₀ 9,28 – 10,10 μM).

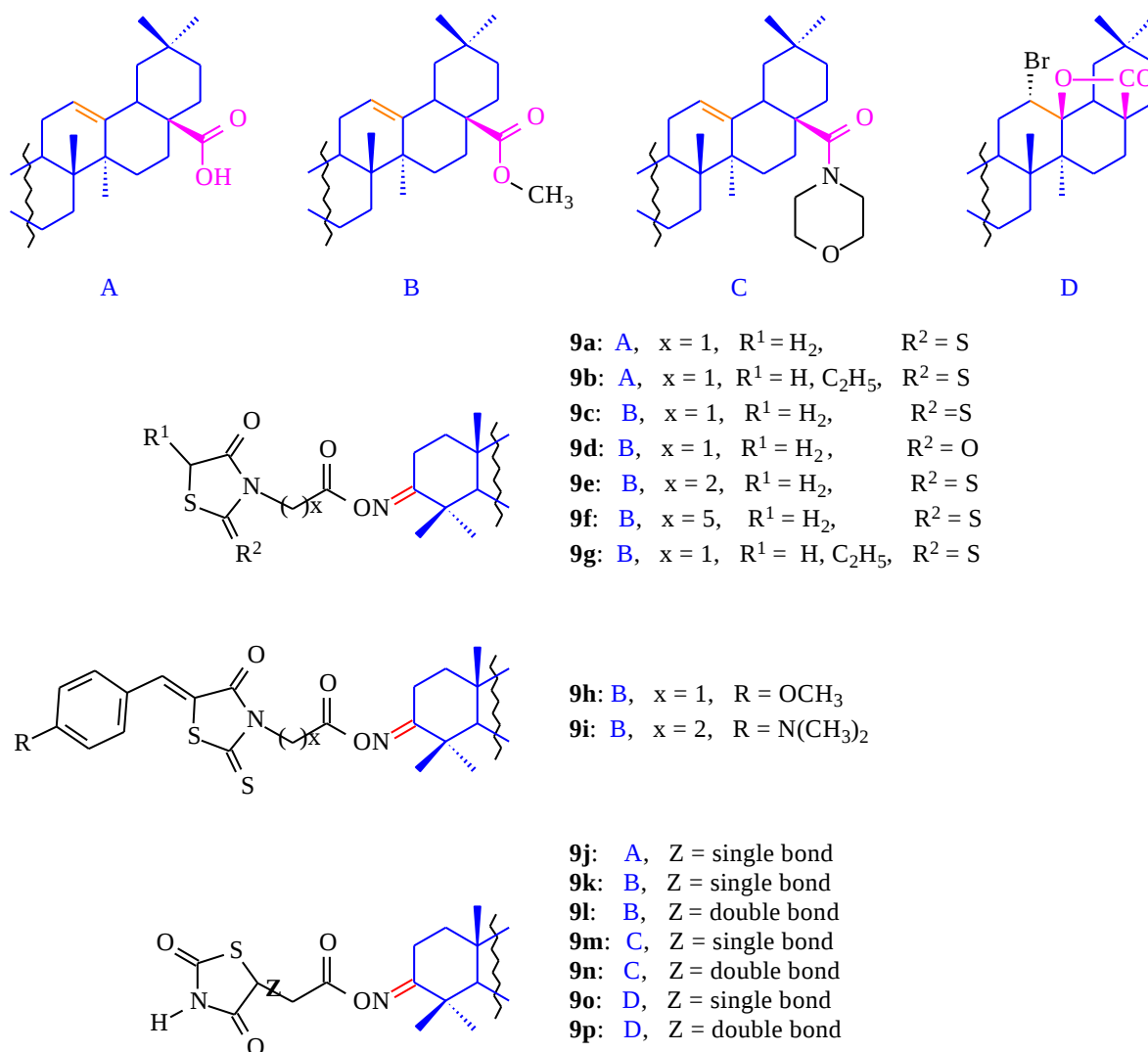
Najbardziej perspektywiczne rezultaty otrzymano dla *O*-acylowanego C-oksymu **8d**, z ugrupowaniem propionoksyiminowym w położeniu C-12 szkieletu oleananu. Związek ten okazał się być około 6,5 razy bardziej aktywny niż OA (**1**) w stosunku do linii MCF-7 oraz HeLa (IC₅₀, odpowiednio, 2,13 oraz 1,87 μM) i aż 21 razy bardziej aktywny niż OA (**1**) w stosunku do linii nowotworowej KB, wartość IC₅₀ wynosiła 0,72 μM.

Powyższe rezultaty potwierdzają wcześniejsze założenie, że wprowadzenie grupy propionylowej w miejsce hydroksylowej w obrębie ugrupowania hydroksyiminowego podwyższa aktywność przeciwnowotworową nowej pochodnej. Związek **8d**, z takim właśnie podstawnikiem, w porównaniu do macierzystego oksymu **7b** wykazywał wprawdzie zbliżony poziom aktywności przeciwnowotworowej w przypadku komórek HeLa, ale ta sama pochodna **8d** była niemal 3 razy bardziej aktywna w stosunku do komórek nowotworowych KB i ponad 5 razy bardziej aktywna, w porównaniu do oksymu **7b**, w stosunku do linii MCF-7.

W poszukiwaniu nowych aktywnych i perspektywicznych przeciwnowotworowych pochodnych kwasu oleanolowego zwrócono uwagę na połączenia triterpenów i związków heterocyklicznych, również o aktywności przeciwnowotworowej. Kwasy 4-tiazolidono-3(5)-karboksylowe reprezentują jedną z najbardziej obiecujących grup spośród analogów 4-tiazolidonu i pokrewnych pochodnych, będącymi związkami o szerokim spektrum właściwości farmakologicznych, w tym przeciwnowotworowych [35]. Ponieważ triterpeny wykazują wpływ na transport przezskórny [np. 36 – 38], hybrydy typu triterpen – 4-tiazolidon mogłyby być zastosowane jako systemy przenośnikowe, w których fragment triterpenowy nie tylko wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, ale również odgrywa rolę transportera biologicznie aktywnego fragmentu z układem 4-tiazolidonu. Połączenie powyższych dwóch fragmentów w jedną cząsteczkę może podwyższyć aktywność obydwu fragmentów i/lub poprawić charakterystykę lekopodobną cząsteczki.

Druga praca stanowiąca część prezentowanego Osiągnięcia, opublikowana w *Medicinal and Chemistry Research* (H.2), omawia zastosowanie opracowanej metody acylowania oksymów kwasu oleanolowego oraz działanie przeciwnowotworowe otrzymanych pochodnych. **Rys. 5** przedstawia struktury otrzymanych pochodnych kwasu oleanolowego o charakterze *O*-acylowanych oksymów (związki **9a – p**).

Celem otrzymania żądanych związków **9a – p**, oksymy kwasu oleanolowego, o strukturach A – D, acylowano heterocyklicznymi kwasami karboksylowymi z pierścieniem tiazolu w obecności N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), w osuszonym dioksanie lub THF w temperaturze pokojowej, zgodnie z metodą opracowaną i omówioną w **H.1**. Reakcje kontrolowano metodą TLC. Struktury otrzymanych pochodnych **9a – p** potwierdzono metodami spektralnymi (IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS).



Rys. 5. Pochodne kwasu oleanolowego **9a – p** o aktywności przeciwnowotworowej z grupą acyloksyiminową w pozycji C-3 zawierającą zmodyfikowany pierścień tiazolinowy.

Nowo otrzymane związki zostały poddane badaniom screeningowym *in vitro*, przeprowadzanym przez program National Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutic Program [39], pod kątem oceny ich aktywności przeciwnowotworowej. Zgodnie z protokołem

US NCI zastosowana została metoda SRB [41]. Badane *O*-acylowane pochodne oksymów kwasu oleanolowego zostały najpierw poddane wstępnym testom na aktywność przeciwnowotworową na około 60 liniach komórek nowotworowych, dla stężenia 10^{-5} M. Linie komórek ludzkich nowotworów wywodziły się z dziewięciu typów i były to nowotwory: białaczki, czerniaka, płuc, jelita grubego, centralnego układu nerwowego, jajnika, nerek, prostaty i piersi. Wyniki przedstawiono jako procentowy wzrost ilości komórek nowotworowych traktowanych roztworem badanego triterpenu w stosunku do próby kontrolnej, którą stanowiły te same komórki nie poddane działaniu triterpenu.

Wprawdzie testowane *O*-acylowane oksymy kwasu oleanolowego **9a – p** (Rys. 5) wykazywały umiarkowane działanie przeciwnowotworowe, ale jednocześnie wykazały istotny specyficzny wpływ na niektóre linie komórek nowotworowych. Analiza otrzymanych wyników wskazała, że najbardziej wrażliwe na działanie triterpenów, spośród wszystkich badanych linii komórek nowotworowych, okazały się wszystkie rodzaje białaczki, w szczególności jeśli chodzi o aktywność przeciwnowotworową pochodnych **9h** i **9i**, obydwie one posiadały układ aromatyczny przyłączony do pierścienia tiazolidynonu. Acylowane oksymy **9a – p** powodowały nie tylko zahamowanie wzrostu ilości komórek nowotworowych, ale nawet śmierć tych komórek, co zostało wyrażone jako przyrost ilości komórek nowotworowych ze znakiem ujemnym. Ten fakt może zostać wykorzystany w przyszłości podczas projektowania syntezy czynników przeciwbiałczkowych.

Najbardziej perspektywicznymi związkami o działaniu przeciwnowotworowym okazały się acylowane oksymy **9b**, **9d** oraz **9l**, przy czym najbardziej aktywny był ten ostatni (**H.2**). Wymienione trzy związki wybrano do zaawansowanych badań screeningowych, również na 60 liniach komórek nowotworowych wymienionych powyżej typów, ale w pięciu różnych stężeniach (10^{-4} – 10^{-8} M). Wyniki wyrażono jako log GI₅₀, log TGI, log LC₅₀ (GI₅₀: stężenie molowe związku powodujące 50% zahamowanie wzrostu komórek; TGI: stężenie molowe związku powodujące całkowite zahamowanie wzrostu komórek; LC₅₀: stężenie molowe związku powodujące śmierć 50% komórek). Otrzymane wyniki wykazały, że związek **9l** charakteryzował się wywieraniem silnego efektu na wszystkie rodzaje komórek nowotworowych z nieznaczną selektywnością w stosunku do linii komórek różnych typów białaczek. Acylowane oksymy **9b** oraz **9d** wykazywały łagodne parametry dawkozależne.

Z nienowotworowego testu toksyczności przeprowadzonego na zwierzętach [42] wynikało, że związek **9l** wykazał maksymalną dawkę tolerowaną powyżej 400mg/kg. Fakt ten może zostać wykorzystany celem obliczenia dawki badanego triterpenu **9l** podawanego

myszom podczas badań aktywności przeciwnowotworowej tego związku w przeprowadzanych w przyszłości testach *in vivo*.

Jak przedstawiono w **H.1** oraz **H.2**, reakcje acylowania oksymów kwasu oleanolowego polegały na użyciu niewielkiego nadmiaru kwasu karboksylowego oraz DCC jako czynnika sprzęgającego, co prowadziło do otrzymania zaplanowanych O-acylowanych oksymów z wysokimi wydajnościami i o wysokim stopniu czystości. Trzecia praca wchodząca w skład Osiągnięcia Habilitacyjnego, opublikowana w ***Phytochemistry Reviews*** (**H.3**) prezentuje przegląd metod acylowania oksymów triterpenowych w latach 1998 – 2013, łącznie z metodą przedstawioną w **H.1** oraz **H.2**. Jak prezentuje przegląd piśmiennictwa dotyczącego tej tematyki, O-acylowane oksymy otrzymano w grupie triterpenów o szkielecie lupanu (betulina, kwas betulinowy i otrzymane z betuliny: 28-oksoallobetulon oraz allobetulon, o odmiennym szkielecie) i oleananu (kwas oleanolowy, maslinowy i glicyretynowy). Reakcje przeprowadzono z zastosowaniem różnych metod, takich jak:

- 1) ogrzewanie we wrzącej pirydynie roztworu oksymu triterpenowego, bezwodnika kwasu karboksylowego i DMAP;
- 2) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego i bezwodnika kwasu karboksylowego bez dodatku katalizatora czy czynnika sprzęgającego w pirydynie w temperaturze pokojowej;
- 3) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego, bezwodnika kwasu karboksylowego oraz trietyloaminy (Et_3N) w benzenie w temperaturze pokojowej;
- 4) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego, bezwodnika kwasu karboksylowego oraz DMAP w THF w temperaturze pokojowej;
- 5) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego, bezwodnika kwasu karboksylowego, Et_3N i DMAP w chlorku metylenu w temperaturze pokojowej;
- 6) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego i chlorku kwasu karboksylowego bez katalizatora czy czynnika sprzęgającego w DMF w temperaturze pokojowej;
- 7) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego i chlorku kwasu karboksylowego bez katalizatora czy czynnika sprzęgającego w THF w temperaturze 60 °C;
- 8) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego, kwasu karboksylowego, DMAP i DCC w THF w temperaturze pokojowej;
- 9) mieszanie roztworu oksymu triterpenowego, kwasu karboksylowego i DCC w dioksanie (rzadziej w DMF lub w THF) w temperaturze pokojowej; metoda mojego autorstwa.

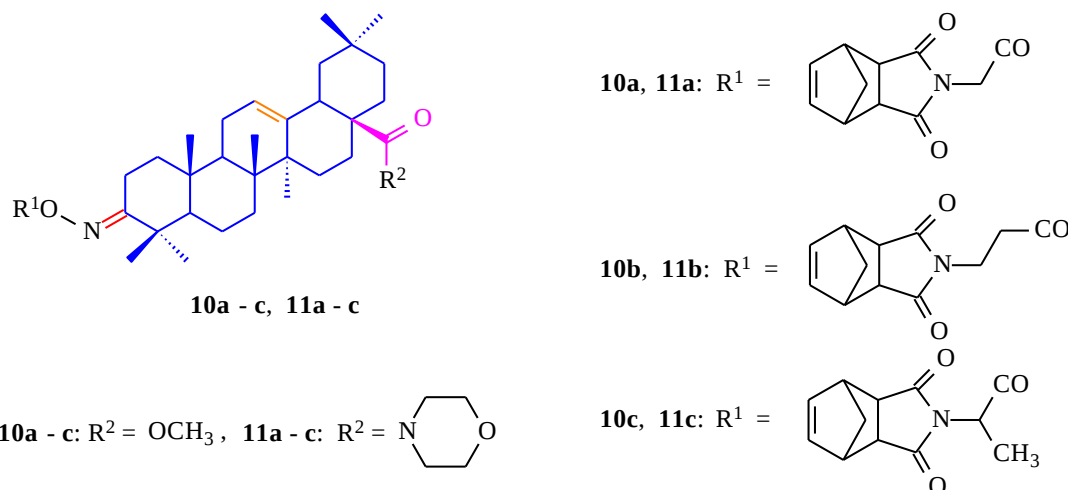
Wydajności otrzymania żądanych *O*-acylowanych oksymów wahały się od 36% do > 90%, a w wielu przypadkach niezbędne było stosowanie czasochłonnych metod oczyszczania wymagających dużych ilości rozpuszczalników (np. chrom. kolumnowa RP-18, a następnie chrom. kolumnowa na żelu krzemionkowym). Porównując wszystkie te metody, można łatwo zauważyć, że najwygodniejszą metodą syntezy *O*-acylowanych oksymów triterpenowych stanowi ostatnie rozwiązanie, prowadzące do wysokich wydajności żądanych produktów (ponad 90%) o wysokim stopniu czystości. Powyższy prosty i szybki sposób wymaga zastosowania małych ilości rozpuszczalników, doskonale rozpuszczających się w wodzie, co zapewnia prostą obróbkę.

Porównanie metod *O*-acylowania oksymów triterpenowych, zaprezentowane w powyższej pracy przeglądowej (**H.3**) stanowiło doskonałe potwierdzenie słuszności opracowania nowej wygodnej i efektywnej metody syntezy żądanych związków chemicznych.

Następną grupą związków, które przyciągnęły moją uwagę, były heterocykliczne kwasy karboksylowe z układem norbornenu. Kwasy karboksylowe zawierające krótki łańcuch alkilowy przyłączony poprzez atom azotu do układu norborneno-2,3-dikarboksyimidowego określone zostały, podczas poszukiwania związków cytotoksycznych, jako układy przyszłościowe [np. 41]. Zmodyfikowany układ norbornenu może być użyty jako nanonośnik czynników przeciwnowotworowych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, zdecydowano otrzymać pochodne oksymów kwasu oleanolowego, w których dokonane zostaną dwa rodzaje chemicznej modyfikacji cząsteczki: (I) układ C-3 hydroksyiminowy (HON=) został acylowany grupami acylowymi zawierającymi krótkie łańcuchy alkilowe, przyłączone poprzez atom azotu do reszty norborneno-2,3-dikarboksyimidowej (w skrócie: norborneno-imidowej) z zastosowaniem wcześniej opracowanej metody, zaprezentowanej w **H.1** oraz **H.2** oraz (II) grupę C-17 karboksylową przekształcono w ester metylowy lub morfolid. Wyniki opublikowano w *Acta Poloniae Pharmaceutica* (**H.4**). Struktury otrzymanych związków przedstawia **Rys. 6**.

W większości wcześniej prezentowanych przypadków (**H.1** oraz **H.2**) reakcja *O*-acylowania oksymów kwasu oleanolowego była zakończona po około 30 minutach mieszania. Acylowanie oksymów kwasu oleanolowego kwasami karboksylowymi z układem norborneno-imidowym była wydłużona do 60, a nawet 90 minut, prawdopodobnie z powodu obecności dużych grup acylowych, które generują zawadę przestrzenną, a ponadto taki rodzaj grupy alkilowej osłabia moc kwasu karboksylowego, z którego ta reszta się wywodzi.

Otrzymane *O*-acylowane oksymy kwasu oleanolowego **10a – c** oraz **11a – c**, jak również związek macierzysty (**1**) poddano badaniom biologicznym z zastosowaniem metody MTT, celem oceny ich aktywności przeciwnowotworowej. W testach tych wykorzystano pięć linii komórek nowotworowych: HeLa, KB, MCF-7, Hep-G2 and HDF.

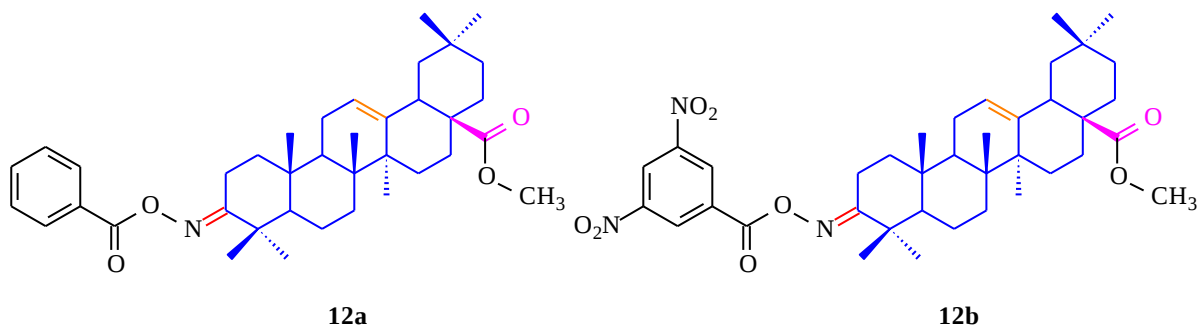


Rys. 6. Pochodne kwasu oleanolowego **10a – c** and **11a – c** o aktywności przeciwnowotworowej, z grupą C-3 acyloxyiminową zawierającą zmodyfikowany układ norbornenu.

W wyniku przekształcenia kwasu oleanolowego (**1**) w ester metylowy z układem norborneno-imido-acetoksyiminowym (związek **10a**) lub norborneno-imido-propionoksyiminowym (pochodna **10b**) w pozycji C-3 uzyskano poprawę aktywności przeciwnowotworowej w porównaniu z kwasem oleanolowym (**1**). *O*-Acyłowany oksym **10a** był od 1,1- do 1,6-krotnie bardziej aktywny względem badanych linii nowotworowych niż kwas oleanolowy (**1**), wartości IC_{50} wynosiły od 9,33 μM (MCF-7) do 11,95 μM (HDF), natomiast *O*-acyłowany oksym **10b** był z kolei od 2,8- do nawet 5,1- krotnie bardziej aktywny niż OA (**1**), wartości IC_{50} wahały się od 2,75 μM (MCF-7) to 4,36 μM (HDF). Obecność grupy acylowej z łańcuchem izopropionowym (pochodna **10c**) zamiast propionowym (pochodna **10b**) prowadziła do spadku aktywności cytotoksycznej: wartości IC_{50} dla związku **10c** wahały się od około 48 μM (KB) do około 98 μM (HDF). Wyniki te potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że obecność w cząsteczce grupy propionoksyiminowej istotnie podwyższa aktywność przeciwnowotworową otrzymanego *O*-acyłowanego oksymu triterpenowego.

Obecność grupy morfolidowej w pozycji C-17 związków **11a** oraz **11c** powodowała, że otrzymane morfolidy były co najwyżej tak aktywne jak kwas oleanolowy, lub nawet działały słabiej (**11b**).

Podjmując kolejne próby zaprojektowania związku chemicznego o podwyższonej aktywności cytotoksycznej, oksym oleanolanu metylu acylowano kwasem benzoesowym i 3,5-dinitrobenzoesowym (**H.5**), stosując wcześniej opracowaną metodę. Struktury otrzymanych związków przedstawia **Rys. 8**. Ze względu na swoją zdolność do ulegania procesom wieloelektronowej redukcji, aromatyczne związki nitrowe uważane są za obiecujące czynniki cytotoksyczne [42]. Aktywność biologiczna nitrozwiązków jest związana z redukcją grupy nitrowej, po której to reakcji zachodzą interakcje aktywnych produktów pośrednich (nitrowe anionorodniki) z DNA, które indukują uszkodzenia biochemiczne [43]. Ze względu na duże podobieństwo pomiędzy enzymatycznymi reakcjami redox i reakcjami elektrochemicznymi na granicy elektrody i roztworu, analiza mechanizmu elektrochemicznej redukcji związków nitrowych stanowi szeroko stosowaną metodę, pozwalającą pozyskać informacje dotyczące aktywności farmakologicznej związku chemicznego zawierającego w cząsteczce grupę nitrową [44]. Aktywność przeciwnowotworową badanych związków oceniono dla pięciu linii komórek nowotworowych: HeLa, KB, MCF-7, A-549 oraz HDF, z zastosowaniem testu SRB, wyznaczono również współczynnik selektywności SI badanych związków.



Rys. 7. Pochodne kwasu oleanolowego **12a** oraz **12b** o działaniu przeciwnowotworowym, z grupą C-3 acyloksyiminową zawierającą resztę kwasu benzoesowego lub 3,5-dinitrobenzoesowego.

Zaobserwowano, że O-acylowany oksym kwasu oleanolowego, zawierający grupę benzoilową (**12a**) wykazywał słaby efekt cytotoksyczny w stosunku do wszystkich badanych linii komórek nowotworowych, wartości IC₅₀ znajdowały się w zakresie ~73 – 113 μM (dla

kwasy oleanolowe, **1**, wartości te wynosiły $\sim 8 - 18 \mu\text{M}$). Dla 3,5-dinitropochodnej oksymu kwasu oleanolowego (**12b**) wartości IC_{50} wahały się od $\sim 4 - 6 \mu\text{M}$. Celem sprawdzenia, czy dinitropochodna **12b** może ulegać reakcjom redox w obrębie komórki, zastosowano techniki elektrochemiczne: cykliczną woltamperometrię, spektroelektrochemię UV-Vis oraz spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electron paramagnetic resonance*, EPR).

Pomiary elektrochemiczne z zastosowaniem cyklicznej woltamperometrii wykazały, że O-acylowany oksym **12b**, zawierający grupę 3,5-dinitrobenzylową w obrębie ugrupowania acyloksyiminowego, ulega wieloetapowej redukcji, z wytworzeniem anionorodników. Widmo UV-Vis wykazało, że generowane elektrycznie anionorodniki powstałe ze związku **12b** są względnie stałe i nie ulegają dalszym przemianom, grupa nitrowa nie jest protonowana, a jej redukcja zachodzi poprzez anionorodnik nitrozyłowy. Pomiary EPR potwierdziły obecność 5-podstawionego anionorodnika 1,3-dinitrobenzenowego, wywodzącego się z pochodnej **12a**.

Wartości SI kwasu oleanolowego i jego oksymów **12a** oraz **12b** wykazały, że wprowadzie działanie cytotoksyczne najbardziej aktywnego związku, O-acylowanego oksymu **12b** było ponad trzy razy silniejsze, niż działanie OA (**1**), to jednak wartość SI dla tegoż oksymu **12b** okazała się być porównywalna do wartości SI kwasu oleanolowego (**1**). Nawet jeśli jednak wartości SI dla badanych związków **1**, **12a** oraz **12b** nie były szczególnie wysokie, to otrzymane wyniki wykazały, że cytotoksyczność grupy nitrowej może zostać skierowana ku specyficznym rodzajom nowotworu.

Powyższe rezultaty zostały opublikowane w *Future Medicinal Chemistry* (H.5).

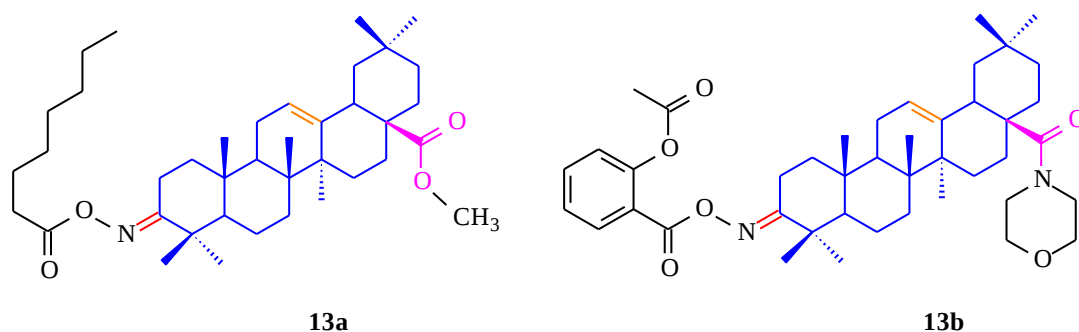
Nowe O-acylowane oksymy kwasu oleanolowego o aktywności przeciwnowotworowej oraz opracowana metoda ich syntezy zostały objęte polskim patentem (H.6).

Wszystkie powyższe wyniki sugerują potrzebę przeprowadzenia dalszych eksperymentów w zakresie O-acylowanych oksymów kwasu oleanolowego, jako przyszłościowych czynników przeciwnowotworowych.

II. 2. Synteza nowych O-acylowych pochodnych kwasu oleanolowego oraz ocena ich aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej

Wcześniej opracowaną metodę syntezy O-acylowanych oksymów kwasu oleanolowego zastosowano również do otrzymania nowych pochodnych o aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej. Wyniki zaprezentowano w pracy opublikowanej w *European Journal of Pharmacological Sciences* (H.7). Jak wykazał Soldi [26], 3-O-acyłowe pochodne triterpenowe z łańcuchem oktanowym były najbardziej aktywnymi czynnikami przeciwbólowymi w modelu bólu wywołanym działaniem kwasu octowego. W świetle tych rezultatów moje starania dotyczące otrzymania nowych związków o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym również skupiły się na strukturalnej modyfikacji w pozycji C-3 kwasu oleanolowego (**1**) z zastosowaniem reszty oktylowej.

Panel chemiczny eksperymentów zawierał syntezę oksymu kwasu oleanolowego ze zmodyfikowaną grupą C-17 karboksylową i dalsze O-acylowanie otrzymanej pochodnej hydroksyiminowej. Ponieważ triterpeny z niezmienioną grupą C-17 –COOH są mniej rozpuszczalne w różnorodnych rozpuszczalnikach stosowanych w badaniach biologicznych, zdecydowano przekształcić powyższą grupę karboksylową w ester metylowy. Zaplanowany 3-O-acylowany oksym oleanolanu metylu (**Rys. 8**, związek **13a**), uzyskany w rezultacie trzech kolejnych etapów syntezy, otrzymano z wydajnością około 93%, w formie bezpostaciowego proszku. Poddano go serii eksperymentów biologicznych, oceniających jego toksyczność ostrą, wpływ na aktywność ruchową zwierząt, jak również aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną.



Rys. 8. Pochodne kwasu oleanolowego **13a** oraz **13b** o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym, z grupą C-3 acyloksyiminową zawierającą resztę kwasu oktanowego lub aspiryny.

Jak udowodniły otrzymane wyniki, związek **13a** wykazał niską toksyczność, wartość LD₅₀ wynosiła poniżej 2,0 g/kg (**H.7**). Ponadto omawiany O-acylowany oksym nie wywierał wpływu na aktywność ruchową zwierząt, zatem można również wykluczyć wywieranie przez ten związek działania stymulującego, jak i sedatywnego. Stwierdzono również, że związek **13a** wywoływał działanie przeciwbólowe (analgetyczne) w dawce 300,0 mg/kg po 60 minutach od momentu jego podania zwierzęciu. Po łącznym podaniu związku **13a** (3,0, 30,0 100,0 oraz 300,0 mg/kg, s.c.) oraz morfiny (5,0 mg/kg, s.c.) efekt synergistyczny zaobserwowano w przypadku dwóch dawek związku **13a**: 30,0 oraz 300,0 mg/kg. Ponadto związek **13a** wykazywał działanie przeciwzapalne, o U-kształtnej krzywej zależności dawka-odpowiedź. Efekt ten był porównywalny z efektem zaobserwowanym dla diklofenaku w dawce 3,0 mg/kg. Triterpen **13a** nie wywoływał jednak istotnych interakcji z tym niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym.

W poszukiwaniu nowych O-acylowanych oksymów kwasu oleanolowego o aktywności farmakologicznej, uwagę zwrócono na morfolidy. Jak wykazały nasze wcześniejsze eksperymenty, morfolidy kwasu oleanolowego ze zmodyfikowaną grupą w pozycji C-3 są skutecznymi promotorami transportu przez skórę progesteronu w teście na modelu skóry ludzkiej [45]. Jednocześnie O-acylowane oksymy morfolidu kwasu oleanolowego wykazują pewien poziom aktywności przeciwnowotworowej (**H.4**). Jak już wspomniano wcześniej, koniugat kwasu salicylowego i morfoliny wykazywał właściwości przeciwzapalne [27]. Maia udowodnił, że kwas oleanolowy wykazuje dawkozależne działanie przeciwbólowe (antynocyceptywne), a jego działanie jest związane z receptorami waniloidowymi i opioidowymi [25]. W świetle powyższych faktów zdecydowano połączyć trzy elementy wykazujące aktywność przeciwbólową (analgetyczną) lub/i przeciwzapalną: (I) szkielet oleananu, (II) pierścień morfolinowy oraz (III) resztę kwasu acetylosalicylowego. Ostatni etap chemicznych transformacji, prowadzący do „3-O-aspirynoksyiminowej” pochodnej morfolidu kwasu oleanolowego przeprowadzono z zastosowaniem wcześniej opracowanej metody, obejmującej mieszanie reagentów w dioksanie w temperaturze pokojowej w obecności DCC jako czynnika kondensującego. Strukturę otrzymanego O-acylowanego oksymu przedstawiono na **Rys. 8**, związek **13b**. Otrzymany koniugat triterpen-aspiryna poddano serii badań biologicznych, celem oceny aktywności przeciwbólowej (analgetycznej) i przeciwzapalnej. Wyniki tych eksperymentów zostały opublikowane w *Frontiers in Pharmacology* (**H.8**).

O-acylowany oksym **13b** (**Rys. 8**) wykazał niską toksyczność, o wartości LD₅₀ poniżej 2g/kg; związek ten nie spowodował śmierci ani efektu toksycznego testowanych zwierząt w ciągu następnych 21 dni. Nie wykazał wpływu na aktywność ruchową myszy, stąd wykluczono jego efekt stymulacyjny i sedatywny, podobnie, jak miało to miejsce w przypadku triterpenu **13a** (**H.7**). Jednorazowe podanie związku **13b** w żadnej z dawek: 0,3, 3,0, 30,0 ani 300,0 mg/kg (*p.o.*) nie spowodowało istotnych różnic w aktywności horyzontalnej myszy. O-acylowany oksym **13b** wykazał proporcjonalne, dawkozależne działanie przeciwbólowe (antynocyceptywne) oraz silną dawkozależną aktywność przeciwzapalną o odwrotnej U-kształtnej krzywej zależności dawka-odpowiedź, z maksimum dla dawki 30,0 mg/kg. Po łącznym podaniu związku **13b** (30,0 mg/kg, *s.c.*) oraz morfiny (5,0 mg/kg, *s.c.*) zaobserwowano spadek aktywności przeciwbólowej, podczas gdy po jednoczesnym podaniu związku **13b** i naloxonu (3,0 mg/kg, *s.c.*) nie stwierdzono takiego efektu synergistycznego, co raczej wyklucza opioidowy mechanizm działania triterpenu **13b**. Po łącznym podaniu tego związku **13b** z kwasem acetylosalicylowym w teście *hot plate* badany związek **13b** wykazywał wyraźnie podwyższony poziom aktywności przeciwbólowej. Dane te wskazują raczej, że za poziom aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej odpowiada cała cząsteczka związku **13b**, jednakże nie można wykluczyć, że efekt sumaryczny jest wywołany zarówno przez resztę kwasu acetylosalicylowego jak i przez fragment triterpenowy. Nie zaobserwowano tolerancji na pochodną triterpenową **13b**, jako że działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne po długotrwałym podawaniu O-acylowanego oksymu **13b** było porównywalne z działaniem po jednorazowej aplikacji triterpenu.

Widać wyraźnie, że mechanizm działania przeciwzapalnego pochodnej **13b** (jak i związku **13a**) nie jest prosty i wymaga dalszych, bardziej zaawansowanych badań biologicznych.

Wyniki otrzymane dla związku **13b** i opublikowane w **H.8** zostały **nominowane do nagrody** w 3 polskiej edycji konkursu **Prix Galien** w kategorii „**Innowacyjne odkrycie naukowe**” na podstawie zgłoszenia zatytułowanego „**Biokoniugat naturalnie występującego triterpenu i aspiryny, jako wysoce efektywna substancja przeciwbólowa i przeciwzapalna**”, 2015.

Wyniki Osiągnięcia Habilitacyjnego zostały również zaprezentowane w postaci 13 posterów podczas międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych (Załącznik 4,

pozycje **III.B.1, III.B.7, III.B.9, III.B.10, III.B.12, III.B.16, III.B.17, III.B.19, III.B.20, III.B.22, III.B.23, II.B.33** oraz **III.B.37**).

II.3. Współpraca

Testy MTT/SRB triterpenów (**H.1, H.3, H.5**) zostały przeprowadzone przez Dr **Piotra Ruszkowskiego** pod kierownictwem Prof. Dr hab. Bogusława Hładonia lub Prof. Dr hab. Przemysława Mikołajczaka w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Synteza kwasów karboksylowych z układem 4-tiazolidynonu (**H.2**) została przeprowadzona przez Dr **Danyło Kaminsky'ego** pod kierownictwem Prof. Romana Lesyka, Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Lviv National Medical University, Ukraina.

Synteza kwasów karboksylowych z układem norborneno-imidowym (**H.3**) została przeprowadzona przez Dr **Dmytro Atamanyuka** pod kierownictwem Prof. Romana Lesyka, Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Lviv National Medical University, Ukraina.

Pomiary elektrochemiczne wybranych triterpenów zostały przeprowadzone przez Dr **Katarzynę Krukiewicz** oraz Dr **Tomasza Jarosza** pod kierownictwem Prof. Jerzego K. Żaka w Katedrze Chemii Fizycznej i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

Eksperymenty dotyczące aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej wybranych O-acylowanych oksymów kwasu oleanolowego zostały przeprowadzone przez Dr **Natalię Wachowiak**, Mgr **Joannę Marciniak** oraz Mgr **Grzegorza Lewandowskiego** pod kierownictwem Prof. Dr hab. Przemysława Mikołajczaka w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

III. Podsumowanie i wnioski

Zaprezentowane powyżej wyniki udowodniły, że reakcja O-acylowania oksymów kwasu oleanolowego jest wygodną metodą otrzymania nowych pochodnych o wysokim poziomie aktywności farmakologicznej. Opracowana metoda nie wymaga

toksycznych/niebezpiecznych rozpuszczalników ani reagentów, jak również skomplikowanych czy czasochłonnych procesów izolowania i oczyszczania produktów. Substraty w powyższym przekształceniu chemicznym, różnorodne oksymy, mogą być łatwo otrzymywane z macierzystego triterpenu (kwasu oleanolowego) w wyniku dobrze znanych metod syntezy. Opracowana metoda obejmuje mieszanie oksymu w rozpuszczalniku, najkorzystniej dioksanie, THF lub DMF, w temperaturze pokojowej z małym nadmiarem kwasu karboksylowego oraz DCC jako czynnika kondensującego. Zastosowanie kwasu karboksylowego zamiast jego bezwodnika czy chlorku kwasowego oraz użycie odpowiednio dobranego czynnika kondensującego, jakim jest DCC, przyspiesza acylowanie oksymu i tym sposobem skraca czas takiego przekształcenia. Krótki czas reakcji nie wymagającej ogrzewania obniża koszty otrzymania pożądanego produktu. Zastosowanie jedynie małego nadmiaru czynnika acylującego i kondensującego, jak również małych ilości rozpuszczalnika oznacza wytwarzanie mniejszych ilości odpadów chemicznych, mniejsze obciążenie dla środowiska naturalnego i dalsze obniżenie kosztów syntezy. Zastosowanie dobrze mieszającego się z wodą rozpuszczalnika ułatwia obróbkę mieszaniny poreakcyjnej oraz izolowanie i oczyszczanie produktu. W wyniku racjonalnie zaplanowanej syntezy, jak również izolowania i oczyszczania, otrzymuje się związki chemiczne z wysokimi wydajnościami (powyżej 90%) oraz o wysokim stopniu czystości.

Wykazano, że otrzymane *O*-acylowane oksymy kwasu oleanolowego są aktywnymi czynnikami przeciwnowotworowymi. Analiza zależności struktura-aktywność wykazała, że:

- 1) ugrupowanie *O*-acyloksyiminowe jest najważniejszą grupą odpowiedzialną za aktywność przeciwnowotworową pochodnych kwasu oleanolowego (**H.1** – **H.5**);
- 2) grupa *O*-acyloksyiminowa może być umiejscowiona zarówno w pozycji C-3, jak i C-12 (**H.1** – **H.5**), ale w niektórych przypadkach korzystniejsze jest umiejscowienie jej w pozycji C-12 ($IC_{50} < 2 \mu M$, **H.1**);
- 3) grupa acetoksyiminowa w pozycji C-12 jest elementem strukturalnym obniżającym aktywność przeciwnowotworową otrzymanego *O*-acylowanego oksymu kwasu oleanolowego (**H.1**);
- 4) obecność grupy ketonowej w pozycji C-12 cząsteczki pochodnej kwasu oleanolowego nie jest korzystna, ponieważ obniża poziom aktywności przeciwnowotworowej (**H.1**);
- 5) grupa *O*-acyloksyiminowa powinna zawierać krótki łańcuch alkilowy (najkorzystniejsza jest modyfikowana lub niezmieniona reszta kwasu propionowego, **H.1**, **H.3**), pierścień

4-tiazolidynonu połączony z układem aromatycznym (**H.2**), ugrupowanie norborneno-2,3-dikarboksyimidowe (**H.3**) lub grupę 3,4-dinitrobenzoilową (**H.5**).

- 6) grupa C-17 karboksylowa *O*-acylowanych oksymów kwasu oleanolowego powinna być przekształcona w ester metylowy (**H.1 – H.5**), choć w przypadku niektórych pochodnych bardziej korzystna jest jej niezmieniona postać (**H.2**).

Biorąc pod uwagę aktywność farmakologiczną oksymów kwasu oleanolowego, pochodnych 4-tiazolidynonu i pochodnych kwasów norborneno-2,3-dikarboksyimidowych, jest wysoce prawdopodobne, że połączenie triterpenu i powyższych pochodnych heterocyklicznych może zostać wykorzystane do zaprojektowania systemów dostarczających związki aktywne, w których zarówno fragment triterpenowy, jak i heterocykliczny, odgrywa rolę czynnika przeciwnowotworowego, ale również jeden z nich pełni funkcję nośnika substancji drugiej (**H.2, H.4**).

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzone dla oksymu kwasu oleanolowego acylowanego kwasem 3,5-dinitrobenzoesowym, który był aktywnym czynnikiem przeciwnowotworowym wykazały, że związek ten ulega wieloetapowej redukcji grupy nitrowej (**H.5**).

Zastosowanie opracowanej, racjonalnie zaplanowanej metody *O*-acylowania oksymów kwasu oleanolowego pozwoliła otrzymać niskotoksyczne związki o wysokim poziomie aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej. Grupa acyloksyiminowa tych pochodnych zawierała resztę kwasu oktanowego lub acetylosalicylowego. Grupa C-17 karboksylowa została przekształcona w ester metylowy lub morfolid (**H.7, H.8**).

Podsumowując, opracowanie nowej, dogodnej, efektywnej i ekonomicznej metody syntezy pochodnych triterpenowych pozwoliła otrzymać dużą grupę nowych związków z wysoką wydajnością oraz o wysokim poziomie czystości. Uzyskane *O*-acylowane oksymy kwasu oleanolowego częstokroć wykazywały wysoki poziom aktywności farmakologicznej. Otrzymane rezultaty inspirują do dalszych badań chemicznych i farmakologicznych.

IV. Piśmiennictwo

- [1] S.T. Withers, J.D. Keasling. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 73, 980 – 990.
- [2] M.F. Yeung, Ch.T. Che. A review of presence of oleanolic acid in natural products. *Natura Proda Medica*, 2009, 2, 77 – 290.
- [3] T.B. Ayeleso, M.G. Matumba, E. Mukwevho. Oleanolic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules* 2017, 22, e1915.
- [4] T. Mishra, R.K. Arya, S. Meena, P. Joshi, M. Pal, B. Meena, D.K. Upreti, T.S. Rana, D. Datta. Isolation, characterization and anticancer potential of cytotoxic triterpenes from *Betula utilis* bark. *PLoS ONE*, 2016, 11, e0159430.
- [5] I. Liu, L. Zheng, N. Wu, L. Ma, J. Zhong, G. Liu, X. Lin. Oleanolic acid induces metabolic adaptation in cancer cells by activating the AMP-activated protein kinase pathway. *J. Agric. Food. Chem.*, 2014, 62, 5528 – 5537.
- [6] M.H. Shyu, T.C. Kao, G.C. Yen. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 6110 – 6118.
- [7] G. Guo, W. Yao, Q. Zhang, Y. Bo. Oleanolic acid suppresses migration and invasion of malignant glioma cells by inactivating MAPK/ERK signaling pathway. *PLoS ONE*, 2013, 8, e72079.
- [8] S. Ghosh, K. Bishayee, A.R. Khuda-Bukhsh. Oleanolic acid isolated from ethanolic extract of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in A375 skin melanoma cells: drug-DNA interaction and signaling cascade. *J. Integr. Med.*, 2014, 12, 102 – 114.
- [9] R. Zhou, Z. Zhang, L. Zhao, C. Jia, S. Xu, Q. Mai, M. Lu, M. Huang, L. Wang, X. Wang, D. Jin, X. Bai. Inhibition of mTOR signaling by oleanolic acid contributes to its anti-tumor activity in osteosarcoma cells. *J. Orthop. Res.*, 2011, 29, 846 – 852.
- [10] M. Huang, J.J. Lu, M.Q. Huang, J.L. Bao, X.P. Chen, Y.T. Wang. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012, 21, 1801 – 1818.
- [11] W. Zhang, X. Men, P. Lei. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *J. Cancer Res. Ther.*, 2014, 10, 14 – 19.
- [12] D.W. Mu, H.Q. Guo, G.B. Zhou, J.Y. Li, B. Su. Oleanolic acid suppresses the proliferation of human bladder cancer by Akt/mTOR/S6K and ERK1/2 signaling. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, 8, 13864 – 13870.
- [13] L. Li, J. Lin, G. Sun, L. Wei, A. Shen, M. Zhang, J. Peng. Oleanolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis *in vivo* and *in vitro* via suppression of STAT3 and Hedgehog pathways. *Mol. Med. Rep.*, 2016, 13, 5276 – 5282.
- [14] Y. Shi, Q. Song, D. Hu, X. Zhuang, S. Yu, D. Teng. Oleanolic acid induced autophagic cell death in hepatocellular carcinoma cells *via* PI3K/Akt/mTOR and ROS-dependent pathway. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2016, 20, 237 – 243.
- [15] T. Honda, B.V. Rounds, L. Bore, H.J. Finlay, F.G.J. Favaloro, N. Suh, Y. Wang, M.B. Sporn, G.W. Gribble. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified

- rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 4233 – 4246.
- [16] T. Tian, X. Liu, E.S. Lee, J. Sun, Z. Feng, L. Zhao, C. Zhao. Synthesis of novel oleanolic acid and ursolic acid in C-28 position derivatives as potential anticancer agents. *Arch. Pharm. Res.*, 2017, 40, 458 – 468.
- [17] K.Z. Yu, L. Li, S. Zhan, C. Li, Y. Zhao, H. Chen, Y. Meng. Synthesis and anti-tumor activity of oleanolic acid derivatives. *Preprints*, 2017, e2017040120.
- [18] W. Mo, Ch. Su, J. Huang, J. Liu, Zh. Chen, K. Cheng. Synthesis of acyl oleanolic acid-uracil conjugates and their anti-tumor activity. *Chem. Centr. J.*, 2016, 10, 69 – 79.
- [19] A. Paszel, B. Rubiś, B. Bednarczyk-Cwynar, L. Zaprutko, M. Kaczmarek, J. Hofmann, M. Rybczyńska. Oleanolic acid derivative metyl 3,11-dioxoolean-12-en-28-olate targets multidrug resistance related to ABCB1. *Pharm. Rep.*, 2011, 63, 1500 – 1517.
- [20] I. Beseda, L. Czollner, P.S. Shah, R. Khunt, R. Gaware, P. Kosma, Ch. Stanetty, M.C. del Ruiz-Ruiz, H. Amer, K. Mereiter, T. DaCunha, A. Odermatt, D. Claßen-Houben, U. Jordis. Synthesis of glycyrrhetic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 433 – 454.
- [21] I.Ch. Sun, H.K. Wang, Y. Kashiwada, J.K. Shen, L.M. Cosentino, C.H. Chen, L.M. Yang, K.H. Lee. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 4648 – 4657.
- [22] B. Bednarczyk-Cwynar, L. Zaprutko. C-lactam derivatives of oleanolic acid. Hydrolysis and further acylation of methyl acetyloleanolate C-lactam and C-thiolactam. *Nat. Prod. Commun.*, 2014, 9, 375 – 378.
- [23] E.J. Yang, W. Lee, S.K. Ku, K.S. Song, J.S. Bae. Anti-inflammatory activities of oleanolic acid on HMGB1 activated HUVECs. *Food Chem. Toxicol.*, 2012, 50, 1288 – 1294.
- [24] W. Lee, E.J. Yang, S.K. Ku, K.S. Song, J.S. Bae. Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm.*, 2013, 36, 94 – 102.
- [25] J.L. Maia, R.C.P. Lima-Junior, J.P. David, J.M. David, F.A. Santos, V.S. Rao. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates the mustard oil-induced colonic nociception in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29, 82 – 85.
- [26] C. Soldi, M.G. Pizzolatti, A.P. Luiz, R. Marcon, F.C. Meotti, L.A. Mito, A.R.S. Santos. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 3377 – 3386.
- [27] L. Thieblot, J. Berthelay, S. Blaise. Comparative anti-inflammatory action of morpholine salicylate, sodium salicylate and hydrocortisone. *Therapie*, 1961, 16, 666 – 671.
- [28] I. Okamoto, T. Takeya, Y. Kagawa, E. Kotani. Iron (III) picolinate-induced oxygenation and subsequent rearrangement of triterpenoid derivatives with hydrogen peroxide. *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, 48, 120 – 125.

- [29] S. Qian, H. Li, Y. Chen, W. Zhang, S. Yang, Y. Wu, Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Nat. Prod.*, 2010, 73, 1743 – 1750.
- [30] Ch.M. Ma, N. Nakamura, M. Hattori. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization. *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, 48, 1681 – 1688.
- [31] O.B. Flekhter, E.I. Boreko, L.R. Nigmatullina, N.I. Pavlova, N.I. Medvedeva, S.N. Nikolaeva, E.V. Tretyakova, O.V. Savinova, L.A. Baltina, L.T. Karachurina, F.Z. Galin, F.S. Zarudii, G.A. Tolstikov. Synthesis and pharmacological activity of acylated betulonic acid oxides and 28-oxo-allobetulone. *Pharm. Chem. J.*, 2004, 38, 148 – 152.
- [32] R. Mukherjee, M. Jaggi, M.J.A. Siddiqui, S.K. Srivastava, P. Rajendran, A. Vardhan, A.C. Burman. Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine/2-bromo/20,29-dibromo betulonic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 4087 – 4091.
- [33] J. Hu, M. Zhang, Y. Ju. A simple oleanolic acid derivative as potent organogelator. *Soft Matter*, 2009, 5, 4971 – 4974.
- [34] C. Genet, A. Strehle, C. Schmidt, G. Boudjelal, A. Lobstein, K. Schoonjans, M. Souchet, J. Auwerx, R. Saladin, A. Wagner. Structure-activity relationship study of betulonic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 178 – 190.
- [35] R.B. Lesyk, B.S. Zimenkovsky. 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Curr. Org. Chem.*, 2004, 8, 1547 – 1578.
- [36] M.H.K. Konoki, K. Tachibana. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1299, 252 – 258.
- [37] S.K. Han, Y.I. Ko, S.J. Park, I.J. Jin, Y.M. Kim. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, 1997, 32, 769 – 773.
- [38] L. Zaprutko, D. Partyka, B. Bednarczyk-Cwynar. Triterpenoids. Part 21. Olenolic acid azaderivatives as percutaneous transport promoters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 4723 – 4726.
- [39] www.dtp.nci.nih.gov
- [40] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1991, 83, 757 – 766.
- [41] D. Atamanyuk, B. Zimenkovsky, R. Lesyk. Synthesis and anticancer activity of novel thiopyrano[2,3-d]thiazole-based compounds containing norbornene moiety. *J. Sulfur Chem.*, 2008, 29, 151 – 162.
- [42] M. Shabbir, Z. Akhter, I. Ahmad, S. Ahmed, H. Ismail, B. Mirza, V. Mckee, M. Bolte. Synthesis, biological and electrochemical evaluation of novel nitroaromatics as potential anticancerous drugs. *Bioelectrochem.*, 2015, 104, 85 – 92.

- [43] S. Bollo, L.J. Nunez-Vergara, M. Bonta, G. Chauviere, J. Perie, J.A. Squella. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megazol and some related nitroimidazole derivatives. *J. Elec. Chem.*, 2001, 511, 46 – 54.
- [44] X. Jiang, X. Lin. Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochem.*, 2006, 68, 206 – 212.
- [45] B. Bednarczyk-Cwynar, D. Partyka, L. Zaprutko. Simple amides of oleanolic acid as effective penetration enhancers. *PLoS One*, 2015, 10, e0122857.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Przed uzyskanie dyplomu doktora nauk farmaceutycznych moje zainteresowania naukowe skupiały się na chemicznych transformacjach pochodnych kwasu oleanolowego i były przeprowadzane w dwóch obszarach: (I) Synteza pochodnych kwasu oleanolowego z układem laktamowym i tiolaktamowym będących promotorami transportu przezskórnego (temat mojej Rozprawy Doktorskiej) oraz (II) Synteza pochodnych kwasu oleanolowego o perspektywnym zastosowaniu.

Interesowałam się również kosmetycznymi zastosowaniami triterpenów i kwasu liponowego.

5.1.1. Pochodne kwasu oleanolowego z układem laktamowym i tiolaktamowym jako promotory transportu przezskórnego

Przezskórne aplikowanie aktywnych farmakologicznie substancji to jedna z fundamentalnych metod aplikacji, znana i stosowana od wieków, głównie celem wywołania działania miejscowego. Jednakże metoda ta jest ograniczona, ponieważ niewiele substancji może być transportowanych przez skórę, która stanowi naturalną biologiczną barierę dla naszego ciała. Celem zwiększenia tempa penetracji przezskórnej leku lub kosmetyku przez warstwę rogową naskórka, niezbędny jest dodatek pewnego rodzaju substancji. Związki takie mogą odwracalnie zaburzyć ułożenie lipidów w warstwie rogowej, powodując w ten sposób, że stanie się ona bardziej przepuszczalna. Takie substancje znane są jako promotory lub akceleratorzy penetracji przezskórnej.

W 1997 roku opisano wpływ wolnego kwasu oleanolowego na ciekłokrystaliczne membrany liposomowe zbudowane z dipalmitynianu fosfatydylocholiny [1]. Triterpen ten wykazał działanie modulujące płynność owych membran. Pino i in. [2] badali avicyny (saponiny triterpenowe) jako promotory przenikania przezskórnego z zastosowaniem miejscowych anestetyków. Ze względu na to, że 1-dodecyłazacycloheptan-2-one (Azone) jest jednym z najbardziej efektywnych związków, które aktywują penetrację transdermalną i w swojej cząsteczce zawiera siedmioczłonowy pierścień z atomem azotu, postanowiono otrzymać pochodne kwasu oleanolowego z siedmioczłonowym pierścieniem, również zawierających atom azotu, i poddać je badaniom pod kątem ich aktywności wspomagającej transport przezskórny.

Podczas realizacji tego Projektu opracowano nowe metody syntezy, izolowania i oczyszczania znanych lub już opublikowanych pochodnych kwasu oleanolowego lub usprawniono metody już znane. Należą do nich np.: przekształcenie grupy C-17 karboksylowej w bromolakton, hydroksylakton lub morfolid, powtórne przekształcenie układu bromolaktonowego w wolną grupę karboksylową, wprowadzenie dodatkowej grupy karbonylowej w pozycji C-11 („utlenianie allilowe”) lub C-12, przegrupowanie Beckmanna prowadzące do układu laktamowego w pierścieniu A lub C, przekształcenie układu laktamowego w tiolaktamowy, przekształcenie produktu przegrupowania Beckmanna do produktu degradacji Beckmanna („laktamu” do „nitrylu”), różnorodne przekształcenia grupy C-3 hydroksylowej, wprowadzenie dodatkowego pierścienia skondensowanego z układem oleananu i inne. W niektórych przypadkach porównano różne drogi otrzymania tego samego związku.

Przeprowadzenie eksperymentów chemicznych zaplanowanych do rozprawy doktorskiej pozwoliło zaobserwować różnice aktywności różnych grup funkcyjnych w obrębie układu oleananu, jak również różnice w aktywności chemicznej podobnej (lub takiej samej) grupy funkcyjnej znajdującej się w odmiennym sąsiedztwie (np. oksym w pierścieniu C oleanolanu metylu *versus* oksym w pierścieniu C 13→18-hydroksylaktonu kwasu oleanolowego). Obserwacje i rezultaty otrzymane podczas wszystkich tych eksperymentów zostały zastosowane do dalszych syntez nowych pochodnych kwasu oleanolowego, również tych nie zawartych w Rozprawie Doktorskiej.

W wyniku przeprowadzenia eksperymentów zaplanowanych do Rozprawy Doktorskiej otrzymano obszerną grupę pochodnych kwasu oleanolowego (niemal 100 związków), w tym 58 nowych pochodnych, nie opublikowanych do roku 2007. Wśród tych

100 związków, 46 zawierało układ laktamowy lub tiolaktamowy w pierścieniu A lub C. Kilka z nich zawierały dwa układy laktamowe/tiolaktamowe (w pierścieniu A oraz w C) bądź jeden układ laktamowy i jeden tiolaktamowy w obrębie tej samej cząsteczki.

Większość laktamów i tiolaktamów badano w warunkach *in vitro* pod kątem ich zdolności do aktywowania transportu przezskórnego z zastosowaniem metody Fürsta [3] i progesteronu jako substancji modelowej. Jest to szybka metoda pozwalająca ocenić aktywność przyspieszającą transport przezskórny substancji z zastosowaniem modelu ludzkiej skóry, składającego się z pięciu lipofilowych membran.

Wszystkie otrzymane wyniki, dotyczące syntezy zaplanowanych związków, ich aktywności jako promotorów transportu przezskórnego i zależności struktura-aktywność zostały zawarte w mojej Rozprawie Doktorskiej, zatytułowanej „Synteza laktamowych i tiolaktamowych pochodnych kwasu oleanolowego będących aktywatorami transportu przezskórnego”, która została wyróżniona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Część powyższych wyników została opublikowana jeszcze przed otrzymaniem tytułu Doktora, w formie 3 publikacji w czasopismach: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *Farmacja Polska* oraz *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologicznego* (Załącznik 4, pozycje II.A.21, II.D.5 oraz III.E.4).

5.1.2. Synteza pochodnych kwasu oleanolowego o perspektywicznym zastosowaniu

Druga część pochodnych kwasu oleanolowego, która nie została objęta Rozprawą Doktorską, zawiera różnorakie typy nowych związków, takich jak: (I) liczne estry kwasu oleanolowego w obrębie grupy C-17 karboksylowej ich dalsze pochodne, (II) C-3 O-acyłowe pochodne kwasu oleanolowego i jego estrów otrzymane w reakcjach z bezwodnikami bursztynowym, glutarowym, ftalowym i innymi oraz produkty ich dalszych przekształceń (III) hydroksy-, okso- i hydroksyimino-13→28-laktony i ich pochodne, (IV) różnorodne amidy kwasu oleanolowego i ich dalsze pochodne, (V) pochodne z dodatkowym pierścieniem hererocyklicznym, dobudowanym do szkieletu oleananu i wiele innych. Część z tych związków jest w trakcie badań np. pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej lub wkrótce zostanie poddana badaniom, np. zdolności tworzenia żeli, badania napięcia powierzchniowego, badania aktywności antyoksydacyjnej, itd.

5.1.3. Kosmetologiczne zastosowania trójtterpenoidów

Aktywność kosmetologiczną triterpenów omówiono w dwóch publikacjach przeglądowych. Pierwsza z nich, opublikowana w *Polish Journal of Cosmetology*, zawiera informacje dotyczące źródeł niektórych triterpenów oraz zastosowania w kosmetykach owych triterpenów, jak i ekstraktów roślinnych zawierających te związki jako główne składniki (Załącznik 4, pozycja II.D.3). Sposób triterpenów stanowiących składniki kosmetyków do najpopularniejszych należą: kwas glicyretynowy, ursolowy, oleanolowy, betulinowy i azjatykowy, betulina, lupeol, α - i β -amryna, cykloartenol, arnidioł, faradiol oraz niektóre glikozydy triterpenowe, z escyną, ginsenozydami i azjatykozydem na czele. Liczne zastosowania kosmetyczne znalazł również skwaleń, wielonienasycony węglowodór alifatyczny, będący prekursorem terpenoidów i steroidów. Druga publikacja, opublikowana w *Wiadomościach Polskiego Towarzystwa Kosmetologicznego*, przeglądowa skupia się na surowcach roślinnych i aktywności kosmetologicznej triterpenów o szkieletie oleananu. Do najważniejszych związków tej grupy należą: kwas oleanolowy, hederagenina, kwas glicyretynowy, protoescygenina, barryngtogenina i ich naturalne pochodne (Załącznik 4, pozycja III.E.3).

5.1.4. Kosmetologiczne zastosowania kwasu liponowego

Występowanie, mechanizmy zastosowania kosmetologicznego oraz źródła kwasu liponowego przedstawiono w trzech pracach przeglądowych. Pierwsze dwie prace tego typu, opublikowane w *Polish Journal of Cosmetology* oraz w *Kosmetyka i Kosmetologia* (Załącznik 4, pozycja II.D.2 oraz III.E.2), omawiają problem starzenia skóry, tworzenia zmarszczek, działania wolnych rodników, występowania kwasu liponowego i jego aktywności antyoksydacyjnej. Aktywność ta dla kwasu liponowego wyraża się różnymi sposobami, takimi jak: deaktywacja wolnych rodników, naprawa zniszczeń spowodowanych ich działaniem, regeneracja innych antyoksydantów, chelatowanie jonów metali i stymulowanie syntezy glutationu. Publikacja prezentuje również różne typy kosmetyków zawierających kwas liponowy. Główne źródła składników pokarmowych zawierających kwas liponowy zostały przedstawione w trzeciej pracy, również opublikowanej w *Polish Journal of Cosmetology* (Załącznik 4, pozycja II.D.4). Publikacja omawia również biosyntezę kwasu liponowego oraz przedstawia chemiczne metody syntezy tego związku.

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

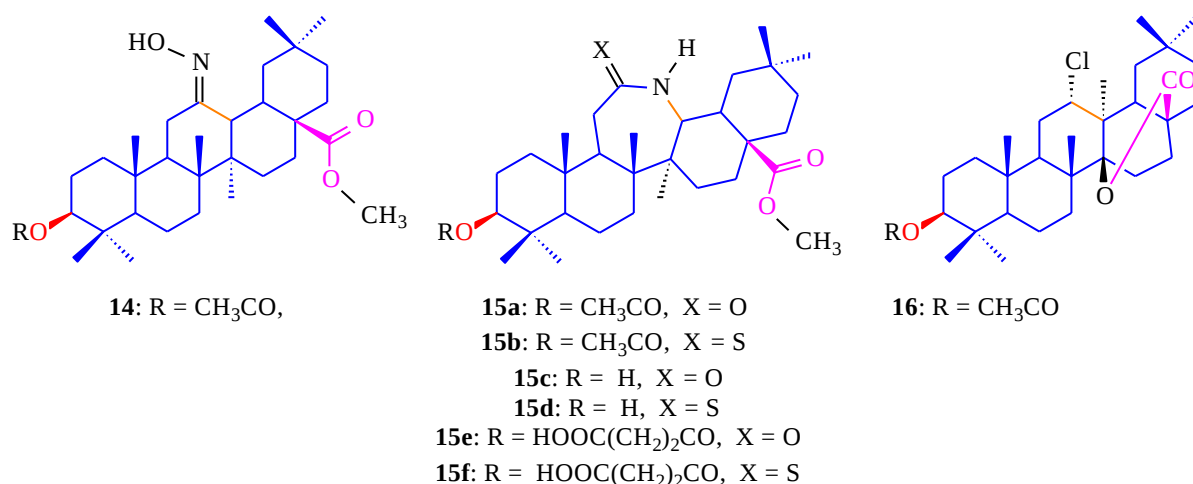
Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moje zainteresowania naukowo-badawcze, oprócz tych omówionych w ramach Osiągnięcia habilitacyjnego, skupiały się w następujących obszarach: (I) Synteza, właściwości fizyko-chemiczne oraz określenie struktury pochodnych kwasu oleanolowego; (II) Synteza pochodnych triterpenów z grupy lupanu o aktywności przeciwnowotworowej; (III) Synteza pochodnych kwasu oleanolowego o aktywności proapoptotycznej; (IV) Immobilizacja i kontrolowane uwalnianie triterpenów z przewodzących matryc polimerowych; (V) Różne dziedziny zastosowania triterpenów; (VI) Synteza różnorodnych pochodnych triterpenowych o zastosowaniu perspektywicznym.

5.2.1. Synteza, właściwości fizyko-chemiczne oraz określenie struktury pochodnych kwasu oleanolowego

Chemiczne przekształcenia kwasu oleanolowego, prowadzące do laktamu i tiolaktamu w pierścieniu C acetylooleanolanu metylu zostały opublikowane w *Natural Product Communications* (Załącznik 4, pozycja II/A/18). Była to pierwsza praca dotycząca syntezy triterpenowego C-laktamu i C-tiolaktamu opublikowana w tych latach. Przedstawiono w niej metody syntezy powyższego C-laktamu i C-tiolaktamu oleanolanu metylu. Na bazie danych spektralnych udowodniono, że C-laktam acetylooleanolanu metylu ma strukturę 12a-aza (**Rys. 9**, zw. **15a**), a nie 11a-aza. Biorąc pod uwagę mechanizm przegrupowania Beckmanna, przyjęto, że macierzysty oksym (**14**), substrat w tej reakcji, jest izomerem *E*.

Przegrupowanie Beckmanna ketoksymu zazwyczaj prowadzi do „normalnego” produktu przegrupowania, czyli amidu; w przypadku cyklicznych ketoksymów taki wewnętrzny amid znany jest jako laktam. Dla oksymów triterpenowych przegrupowanie Beckmanna zachodzi dwukierunkowo i obok laktamu otrzymuje się z niewielką wydajnością (rzędu 20%) produkt „anormalnego” przegrupowania Beckmanna, nityl. W reakcji tej powstają również produkty uboczne. Strukturę jednego z takich produktów ubocznych (**Rys. 9**, zw. **16**), wyizolowanego z mieszaniny związków po przegrupowaniu Beckmanna oksymu w pierścieniu C (**14**), określono z zastosowaniem metody rentgenograficznej. Mechanizm przekształcenia prowadzącego do powyższego związku **16** pozostaje na razie nieznany i wymaga dalszych badań. Powyższe dane opublikowano w *Acta Crystallographica E*

(Załącznik 4, pozycja II/A/17). Struktura anormalnego produktu przegrupowania Beckmanna oksymu **14**, czyli nitrylu, jest w trakcie badań rentgenograficznych.



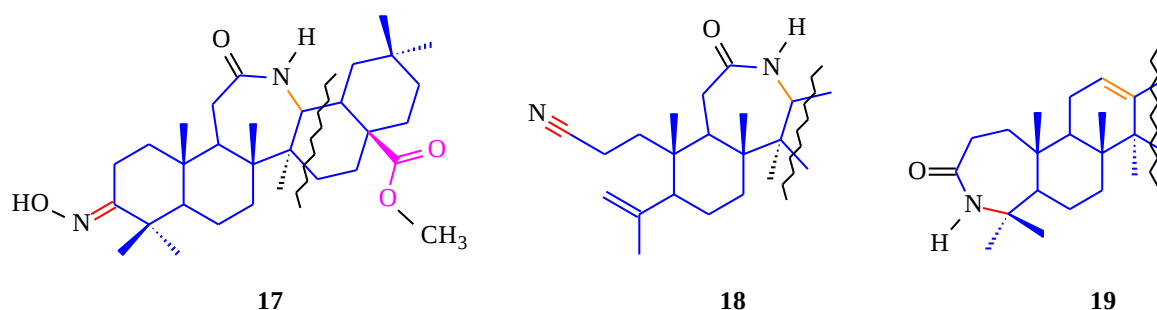
Rys. 9. Struktury oksymu w pierścieniu C (**14**), C-laktamów (**15a**, **15c** oraz **15e**), C-tiolaktamów (**15b**, **15d** and **15f**) oleanolanu metylu oraz chloropochodnej w pierścieniu C 14→28-olidu kwasu oleanolowego (**16**).

Laktam i tiolaktam w pierścieniu C, obydwa wywodzące się z acetylooleanolanu metylu (**Rys. 9**, związki, odpowiednio, **15a** oraz **15b**) poddano alkalicznej hydrolizie i dalszemu acylowaniu z zastosowaniem bezwodnika octowego lub bursztynowego. Opracowane metody syntezy opublikowano w *Natural Product Communications* (Załącznik 4, pozycja II/A/12). Acetylowanie C-3 hydroksylaktamu i tiolaktamu, odpowiednio, **15c** oraz **15d**, za pomocą bezwodnika kwasu bursztynowego, prowadzące do związków, odpowiednio **15e** and **15f**, przyspieszono, dodając do mieszaniny reakcyjnej DMAP. Mechanizm takiej reakcji wyjaśniono w powyższej publikacji. Struktury otrzymanych związków określono na podstawie danych spektralnych.

W wyniku przegrupowania Beckmanna związku z układem oksymowym w pierścieniu A i jednocześnie układem laktamowym w pierścieniu C oleanolanu metylu (**Rys. 10**, zw. **17**) otrzymano, jako produkt uboczny A-nitryl-C-laktam (**18**). Strukturę powyższych związków **17** oraz **18** opublikowano w *Acta Crystallographica E* (Załącznik 4, pozycja II/D/1).

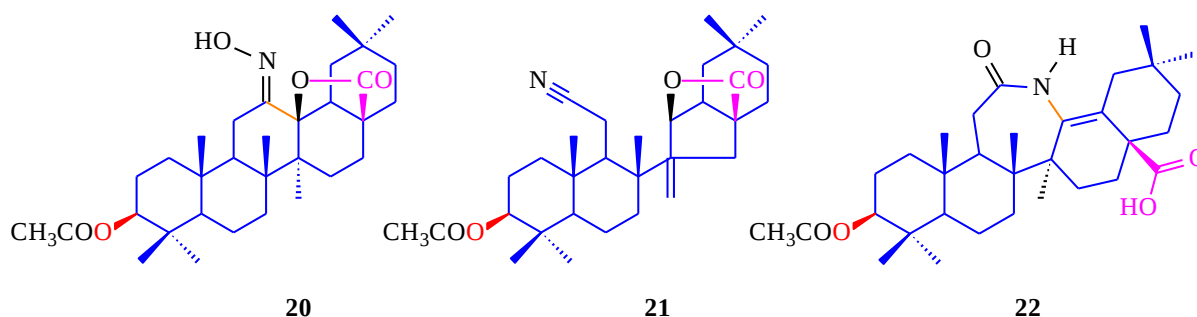
Metodę przegrupowania Beckmanna oksymu w pierścieniu A oleanolanu metylu, prowadzącą do otrzymania laktamu (**Rys. 10**, zw. **19**) i nitrylu również opracowano w ramach eksperymentów do Rozprawy doktorskiej, a opublikowano w *Journal of Molecular*

Structure (Załącznik 4, pozycja II/A/14). Praca zawiera również metody identyfikacji estru metylowego kwasu oleanonowego, jego oksymu, jak również produktów normalnego i anormalnego przegrupowania Beckmanna. Przedstawiono ponadto mechanizm przekształcenia oksymu do powyższych produktów (laktamu i nitrylu).



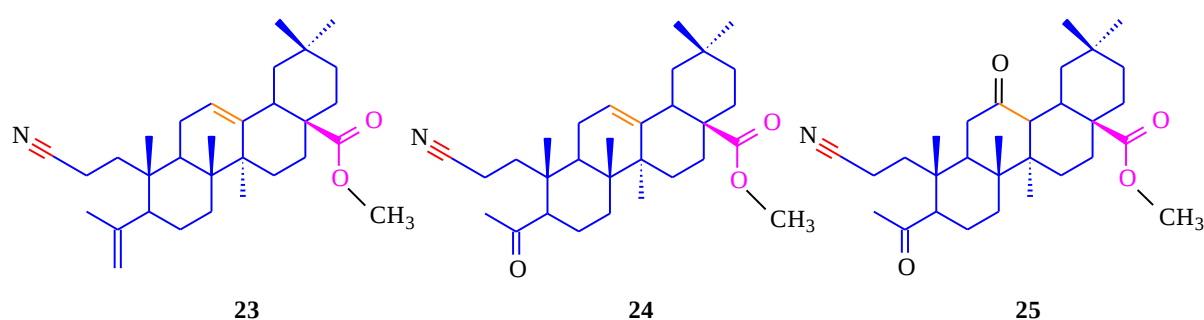
Rys 10. Struktury oksymu-laktamu (17), nitrylu-laktamu (18) oraz laktamu (19) pochodnych oleanolanu metylu.

Utlenianie 3-O-acetoksy-12-hydroksy-13→28-laktonu kwasu oleanolowego oraz dalsza reakcja otrzymanego 12-okso-laktonu prowadzi do oksymu (**Rys. 11**, zw. 20), który również poddano reakcji przegrupowania Beckmanna. Wyizolowano dwa związki, podobnie jak w przypadku analogicznej reakcji innych oksymów kwasu oleanolowego. Opracowana metoda powyższej syntezy, prowadząca do nitrylu 21 oraz laktamu 22 zaprezentowana została w Rozprawie doktorskiej i opublikowana w *Journal of Molecular Structure* (Załącznik 4, pozycja II/A/5). Praca zawiera również metody identyfikacji związków 20 – 22, prawdopodobny mechanizm przekształcenia oksymu 20 do nitrylu 21 oraz laktamu 22, jak również analizę rentgenograficzną powyższych związków.



Rys. 11. Struktury nitrylu (21) i laktamu (22) otrzymanego w wyniku przegrupowania Beckmanna oksymu (20).

Jak wiadomo z piśmiennictwa [4], ozonoliza kwasu oleanolowego (**1**) zachodzi z wytworzeniem pierścienia epoksydowego łączącego atomy węgla 12 oraz 13, który to pierścień reaguje dalej z grupą C-17 karboksylową, tworząc 12-hydroksylakton. Podobne utlenianie przeprowadzono również dla oleanolanu metylu i jego A-nitrylu (**Rys. 12**, zw. **23**), stosując różne stosunki molowe triterpenu i ozonu. W przypadku proporcji triterpenu do ozonu 1:2 otrzymano jedynie pochodną z grupą ketonową w pozycji C-12 (np. nitryl **24**), natomiast gdy stosunek molowy powyższych reagentów wynosił 1:4, otrzymano, jako główny produkt, pochodną 3,12-diketonową, lub 4-12-diketonową (np. nitryl **25**), w zależności od struktury utlenianego związku.



Rys. 12. Struktury A-nitrylu oleanolanu metylu (**23**) oraz produktów jego utleniania ozonem (**24** oraz **25**).

Wyniki powyższych eksperymentów opublikowano, wraz z odpowiednimi procedurami i identyfikacją otrzymanych produktów, w *Chemistry of Natural Compounds* (Załącznik 4, pozycja **II/A/20**).

W wyniku reakcji chlorku kwasu acetylooleanolowego z aniliną lub metyloanilinami (*orto*-, *meta* oraz *para*-toluidyną), otrzymano anilid oraz toluidydy kwasu acetylooleanolowego. Związki te hydrolizowano, a następnie utleniano, a otrzymane C-3 ketopochodne przekształcono w oksymy. Zaobserwowano i wyjaśniono różnice w czasie trwania reakcji triterpenu z aniliną i toluidynami. Powyższe dane, jak również metody syntezy wymienionych amidów oraz ich identyfikację opublikowano w *Natural Product Communication* (Załącznik 4, pozycja **II/A/15**).

5.2.2. Synteza pochodnych triterpenów z grupy lupanu o aktywności przeciwnowotworowej

Metody syntezy lupenonu, jego oksymu i wybranych 3-O-acylowych pochodnych lupeolu, jak również sposoby identyfikacji powyższych związków, opublikowano w *Natural Product Communication* (Załącznik 4, pozycja II/A/6). Otrzymane związki o szkielecie lupanu poddano badaniom metodą MTT, celem określenia ich aktywności przeciwnowotworowej. Testy przeprowadzono na czterech liniach komórek nowotworowych: HeLa, KB, MCF-7 oraz A-549. Wartości IC_{50} dla lupeolu wahały się od 37,7 to 51,8 μM . 3-O-Acyłowe pochodne lupeolu były słabo aktywne lub nieaktywne, wartości IC_{50} wahały się w zakresie 49 – 84 μM . Jedynie utlenianie grupy C-3 –OH do ketonowej spowodowało wyraźny wzrost aktywności przeciwnowotworowej, wartości IC_{50} dla lupenonu wahały się od 7,1 do 9,1 μM . Jednocześnie wprowadzenie grupy C-3 hydroksyiminowej zamiast ketonowej w tej samej pozycji spowodowało, że otrzymany oksym był tylko trochę bardziej aktywny niż macierzysty lupeol, a wartości IC_{50} znajdowały się w zakresie 29,0 do 45,0 μM .

W wyniku stażu naukowego w firmie „Betulinines” w miejscowości Stříbrna Skalice niedaleko Pragi (Czechy) otrzymano dużą grupę estrów kwasów karboksylowych o szkielecie lupanu oraz *des-E*-lupanu (pozbawionego pierścienia E). Reszty estrowe zawierały np. grupę eteru monometylowego glikolu etylenowego (głym), eteru monometylowego glikolu dietylenowego (digłym), bromoetylową, glukozylową, galaktozylową i różne inne. Otrzymane związki najpierw poddano testom z zastosowaniem esteru acetoksymetylowego kalceiny (*calcein AM*), celem oceny ich aktywności przeciwnowotworowej. Zastosowano 5 linii komórkowych: CEM, MCF-7, HeLa, G-361 oraz BJ. Jak wykazały wyniki, dla 12 związków spośród 56 przebadanych wartości $IC_{50} < 10 \mu M$ otrzymano dla przynajmniej trzech, spośród czterech użytych, linii komórek nowotworowych. Analiza Western blot wykazała, że niektóre spośród najbardziej aktywnych estrów wykazała silne właściwości proapoptotyczne. Metody syntezy estrów o szkielecie lupanu oraz *des-E*-lupanu, identyfikację otrzymanych związków oraz wyniki badań biologicznych zostały opublikowane w *European Journal of Medicinal Chemistry* (Załącznik 4, pozycja II/A/2).

5.2.3. Synteza pochodnych kwasu oleanolowego o aktywności proapoptotycznej

Aktywność proapoptotyczną wybranych pochodnych kwasu oleanolowego, otrzymanych w ramach Rozprawy doktorskiej, zaprezentowano w postaci serii pięciu

publikacji. Główne wyniki tych badań biologicznych obejmują również dwa polskie Patenty (Załącznik 4, pozycje: **II/B/1** and **II/B/2**).

Pierwsza praca z tego cyklu prezentuje grupę 12 pochodnych kwasu oleanolowego, były to: trzy ketopochodne w pierścieniu A, trzy oksymy w pierścieniu A, trzy A-laktamy oraz odpowiednie trzy nityle. W powyższych związkach grupę C-17 karboksylową przekształcono w ester metylowy lub morfolid, a do cząsteczek niektórych związków dodatkowo wprowadzono grupę ketonową w pozycji C-11. Wszystkie te związki były poddane testowi MTT, celem oceny ich aktywności przeciwnowotworowej. Wyniki wykazały, że niektóre oksymy oraz wszystkie laktamy powodowały istotne zahamowanie namnażania się komórek nowotworowych linii HeLa, KB, MCF-7 oraz Hep-G2 już w stężeniach mikromolowych. Najbardziej aktywne związki, o strukturze laktamu, zostały następnie poddane tesowi ELISA, aby ocenić, czy badane azapochodne indukują apoptozę. Jak udowodniły otrzymane rezultaty, badane laktamy powodowały znaczący wzrost indukcji apoptozy oraz istotny wzrost fragmentacji DNA. Szczegóły powyższych eksperymentów chemicznych i biologicznych, jak również metody identyfikacji powyższych 12 pochodnych kwasu oleanolowego zaprezentowano w pracy opublikowanej ***Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*** (Attachment 4, position **II.A.8**).

Oporność wielolekowa (*multidrug resistance*, MDR) w pacjentów z nowotworami stanowi dla naukowców, pracujących nad wynalezieniem nowych leków, wielkie wyzwanie. W poszukiwaniu przyszłościowych modulatorów oporności wielolekowej przetestowano grupę syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego. Otrzymane związki, które poddano takim badaniom, zostały zmodyfikowane w pozycjach: C-3, C-11, C-12 oraz C-17 szkieletu oleananu, jak zostało to przedstawione na **Rys. 3**. Badania biologiczne przeprowadzono z zastosowaniem komórek ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej: CCRF-CEM oraz dwóch linii tej samej białaczki o cechach MDR: CCRF-VCR1000 oraz CCRF-ADR5000. Najbardziej efektywny związek, ester metylowy kwasu 3,11-dioksoolean-12-en-28-owego (**Rys. 3**, zw. **6c**) okazał się być silniejszym inhibitorem przeżywalności komórek nowotworowych niż triterpen macierzysty – kwas oleanolowy (**1**). Diketon **6c** wykazał zbliżoną, lub nawet wyższą aktywność w stosunku do komórek o cechach MDR, niż w stosunku do komórek typu dzikiego. Powyższe dane, jak i wyniki eksperymentów przeprowadzonych metodą Western blot oraz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej opublikowano w ***Pharmacological Reports*** (Załącznik 4, pozycja **II/A/19**).

Inna pochodna oleanolanu metylu, z grupą hydroksyiminową w pozycji C-3 i dodatkową grupą ketonową w pozycji C-11 (**Rys. 3**, zw. **6d**) wykazała najwyższy poziom aktywności cytotoksycznej spośród badanych związków (**Rys. 3**) w stosunku do linii MDA-MB-231 (ludzki nowotwór piersi). Związek **6d** istotnie redukował przeżywalność komórek nowotworu piersi, wartość IC_{50} wynosiła 21.08 μ M (24 h po podaniu związku **6d**) oraz 7.33 μ M (72h po podaniu). Triterpen ten indukował śmierć komórek rakowych na drodze apoptozy i autofagii, co zostało udowodnione poprzez aktywację protein: kaspazy-8, kaspazy-3 i jej substratu – PARP-1, uruchomienie ekspresji proteiny LC3-II oraz nadekspresję genu *beclin 1*, wykazane w analizie techniką Western blot. Powyższe dane, jak i wyniki kolejnych eksperymentów opublikowano w *Chemico-Biological Interactions* (Załącznik 4, pozycja II/A/13).

W kolejnej pracy przedstawiono wpływ ośmiu syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (**Rys. 3**, zw. **6a** – **6h**) na komórki lekowrażliwej ostrej białaczki promielotycznej HL-60 oraz jej lekoopornego typu – HL-60/AR. Najbardziej aktywne okazały się dwa związki: 3,11-diokso pochodna **6c** oraz 3-hydroksyimino-11-okso pochodna **6d** (**Rys. 3**). Pierwszy z wymienionych dwóch związków (**6c**) był najbardziej efektywnym aktywatorem indukcji apoptozy komórek HL-60. Związek ten aktywował zarówno zewnętrzny, jak i wewnętrzny szlak apoptotycznej śmierci komórek. Z kolei drugi z wymienionych związków (**6d**) wykazał najsilniejsze działanie w stosunku do lekoopornej linii HL-60/AR. Związek hamował funkcje transportu białka ABCC1 (krótki czas odpowiedzi) i obniżał poziom białka ABCC1 (długi czas odpowiedzi) w efekcie redukcji ekspresji genu *ABCC1*. Wyniki testów biologicznych przeprowadzonych dla pochodnych kwasu oleanolowego **6c** oraz **6d** również opublikowano w *Chemico-Biological Interactions* (Załącznik 4, pozycja II/A/9).

Dwie spośród ośmiu pochodnych kwasu oleanolowego, przedstawionych na **Rys. 3**, związek: **6c** oraz **6h**, obydwa z grupą hydroksyiminową w pozycji C-3, poddano ocenie pod kątem roli, jaką odgrywają w procesie migracji i inwazji komórkowej. Badano wpływ tych związków na cztery linie nowotworów piersi (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 oraz T-47D) i jedną linię nienowotworową, MCF-12A. Obydwa pochodne wykazały wyższy poziom cytotoksyczności niż macierzysty kwas oleanolowy (**1**) i w stężeniach subcytotoksycznych obniżały migrację komórek MCF7, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468, jak również inwazję komórek MCF7 and MDA-MB-231 cells. Obydwa związki nie wykazały wpływu na migrację komórek MCF-12A. Powyższe dane, jak również wyniki

poszczególnych eksperymentów biologicznych zostały opublikowane w ***Chemico-Biological Interactions*** (Załącznik 4, pozycja II/A/3).

Działanie cytoprotekcyjne syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego, rolę triterpenoidów jako modulatorów ścieżki Nrf2/Keap1 oraz aktywność triterpenów jako potencjalnych regulatorów ekspresji miRNA omówiono pokrótce w pracy przeglądowej ***Biomolecules and Therapeutics*** (Załącznik 4, pozycja II/A/16).

5.2.4. Immobilizacja i kontrolowane uwalnianie triterpenów z przewodzących matryc polimerowych

Chemoterapia jest jedną z najszerzej stosowanych metod leczenia nowotworów, jednakże zastosowanie tej metody jest ograniczone, chociażby z powodu ostrych efektów ubocznych działania leków przeciwnowotworowych na zdrowe tkanki. Aby pokonać tę przeszkodę, wkłada się wiele wysiłku, a ostatnie doniesienia naukowe mówią, że jednym z rozwiązań może być wykorzystanie miejscowych systemów dostarczania leków (*drug delivery systems, DDS*) [np. 5].

W ***Acta Biomaterialia*** (Załącznik 4, pozycja II/A/11) opublikowano wyniki eksperymentów dotyczących elektrycznie uruchamianej matrycy polimerowej, opartej o poli(3,4-etylenodioksytiofen), PEDOT, służącej do miejscowego dostarczania jonowej formy związku o działaniu przeciwnowotworowym, kwasu oleanolowego (1). W pracy przedstawiono metodę wytwarzania takiej matrycy oraz wykazano, że warstwy ją tworzące skutecznie i w sposób kontrolowany uwalniają badany związek. Wykazano, że kompozyt PEDOT-OA jest solidnym i opłacalnym materiałem do kontrolowanego dostarczania leków.

W kolejnych eksperymentach, do monitorowania procesu immobilizacji w matrycy z PEDOT i uwalniania związku o działaniu przeciwnowotworowym, disukcynyłowej pochodnej betuliny, zastosowano elektrochemiczną kwarcową krystaliczną mikrowagę oscylacyjną (*electrochemical quartz crystal microbalance, EQCM*). Strukturę i właściwości powierzchni matrycy z PEDOT zawierającej substancję aktywną (disukcynylobetulinę) badano z zastosowaniem m.in. skaningowej mikroskopii elektronowej, spektroskopii IR i spektroskopii Ramana. Uzyskane rezultaty zaprezentowano w ***Electrochimica Acta*** (Załącznik 4, pozycja II/A/7).

Nową metodę wytwarzania przewodzącej matrycy polimerowej zawierającej triterpen o aktywności cytotoksycznej (betulinę) opublikowano w ***Materials Science & Engineering C*** (Załącznik 4, pozycja II/A/4). Obecność betuliny w matrycy polimerowej potwierdzono za

pomocą spektroskopii SEM, EDS oraz IR. Uwalnianie betuliny przeprowadzono dwoma metodami. Aktywność przeciwnowotworową betuliny uwolnionej z matrycy określono w stosunku do dwóch linii komórek nowotworowych, KB oraz MCF-7 w teście z sulforodaminą B (SRB).

5.2.5. Różne dziedziny zastosowania triterpenów

Najnowsze informacje dotyczące kosmetycznych właściwości triterpenów zostały zebrane i opublikowane w postaci pracy przeglądowej w czasopiśmie popularno-naukowym *Chemia i Biznes, Rynek Kosmetyczny i Chemii Gospodarczej* (Załącznik 4, pozycja II/E/1).

Syntetyczne pochodne kwasu oleanolowego z ugrupowaniem amidowym w pozycji C-17 szkieletu triterpenowego są efektywnymi promotorami transportu przezskórnego, co zostało udowodnione w testach biologicznych i opublikowane w *PLoS ONE* (Załącznik 4, pozycja II/A/10). Publikacja zawiera metody syntezy powyższych pochodnych triterpenowych, sposoby ich identyfikacji oraz rezultaty testów *in vitro* dotyczących aktywności wspomagającej transport przezskórny, przeprowadzone z zastosowaniem metody Fürsta [3] i progesteronu jako substancji modelowej. W pracy przedyskutowano zależność pomiędzy strukturą badanych związków i zdolnością do przyspieszania transportu przezskórnego. Najbardziej aktywne związki zawierały układ morfolidowy w pozycji C-17 struktury oleananu. Poziom aktywności wspomagającej transport przezskórny takich morfolidów był w wielu przypadkach wyższy, niż dla N-dodecylokaprolaktamu (Azone®), który jest uważany za jeden z najbardziej efektywnych aktywatorów.

5.2.6. Synteza różnorodnych pochodnych triterpenowych o przyszłościowym zastosowaniu

Ostatnia grupa pochodnych triterpenowych, jeszcze nie opublikowana, obejmuje 4 typy pochodnych: (I) pochodne kwasu oleanolowego w pozycji C-2 cząsteczki; (II) pochodne triterpenów o szkielecie lupanu (głównie lupeolu i betuliny); (III) potrójne estry kwasu oleanolowego; (IV) koniugaty kwasu oleanolowego i związków aktywnych farmakologicznie, głównie NSAID. Niektóre z powyższych pochodnych są w trakcie badań oceniających poziom aktywności przeciwnowotworowej, antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej.

5.3. Współpraca

Analiza rentgenograficzna triterpenów (**Rozdział 5.2.1**) została przeprowadzona przez Dr Annę Froelich pod kierownictwem Prof. UM dr hab. Andrzeja Gzelli w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Reakcje ozonolizy (**Rozdział 5.2.1**) zostały przeprowadzone we współpracy z Dr Natalya Medvedeva z Ufa Scientific Centre, Russia.

Syntezę lupenonu oraz acylowych pochodnych lupeolu (**Rozdział 5.2.2**) przeprowadzono we współpracy z firmą „Natchem” z Krakowa.

Syntezę niektórych estrów kwasów karboksylowych o szkielecie lupanu i *des-E*-lupanu (**Rozdział 5.2.2**) przeprowadzono w firmie „Betulinines” w Stříbrna Skalice koło Pragi (Czechy). Testy kalceinowe MA zostały przeprowadzone przez Prof. Mariana Hajducha z Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, Olomouc, Czechy.

Testy MTT/SRB tests triterpenów (**Rozdział 5.2.2** oraz **5.2.4**) zostały przeprowadzone przez Dr Piotra Ruszkowskiego pod kierownictwem Prof. Dr hab. Przemysława Mikołajczaka w Katedrze Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Aktywność proapoptotyczną triterpenów (**Rozdział 5.2.3**) została przeprowadzona przez Dr Annę Paszel-Jaworską oraz Dr Natalię Lisiak pod kierownictwem Prof. dr hab. Marii Rybczyńskiej w Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Eksperymenty dotyczące immobilizacji i kontrolowanego uwalniania triterpenów z matrycy polimerowej (**Rozdział 5.2.4**) zostały przeprowadzone przez Dr Katarzynę Krukiewicz i Dr Tomasza Jarosza pod kierownictwem Prof. Jerzego K. Żaka w Katedrze Chemii Fizycznej i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

Zdolność do aktywowania transportu przezskórnego przez triterpeny (**Rozdział 5.1.1** oraz **5.2.5**) została zbadana przez Dr Danutę Partykę w Katedrze Technoologii Postaci Leku Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

5.4. Piśmiennictwo

- [1] S.K. Han, Y.I. Ko, S.J. Park, I.J. Jin, Y.M. Kim, Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes, *Lipids*, 1997, 32, 769 – 773.
- [2] Ch.J. Pino, M.A. Scherer, V.P. Shastri, Investigation of the transdermal transport of charged local anesthetics in the presence of triterpene saponin glycosides. *Drug Deliv. and Transl. Res.*, 2014, 4, 131 – 138.
- [3] W. Fürst, R. Neubert, R. Wildner, Drug permeation through synthetic lipid membranes. Part 10: The effects of diffusion layers on the permeation process. *Pharmazie*, 1980, 35, 106 – 109.
- [4] M.S. Ali, M. Jahangir, S.S. ul Hussan, M.I. Choudhary, Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochem.*, 2002, 60, 295 – 299.
- [5] M. Matsusaki, M. Akashi, Functional multilayered capsules for targeting and local drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2009, 6, 1207 – 1217.

6. Podsumowanie

Wyniki moich prac eksperymentalnych, objęte Osiągnięciem habilitacyjnym zostały opublikowane w formie **6 oryginalnych publikacji naukowych, jednej pracy przeglądowej i jednego patentu**, o łącznej sumie współczynnika oddziaływania **Impact Factor 19,554** oraz sumie punktów ministerialnych **KBN/MNiSW 220**. Powyższe wyniki zostały również zaprezentowane w postaci 12 posterów podczas konferencji naukowych.

Mój całkowity dorobek naukowy obejmuje **38 publikacji: 26 prac oryginalnych** pochodzących z bazy Journal Citation Reports (JRC), **2 prac** spoza bazy Journal Citation Reports, **5 prac przeglądowych i 5 innych prac**. Jestem **Pierwszym Autorem** lub **Autorem Korespondencyjnym** w większości tych prac. Jestem również **współautorem 3 patentów i jednego podręcznika**. Sumaryczny współczynnik oddziaływania **Impact Factor wynosi 69,778**, zaś suma punktów ministerialnych **KBN/MNiSw wynosi 790**. Zgodnie z Web of Science, moje publikacje były **cytowane 179 razy**, zaś **indeks Hirsha wynosi 8**. Jestem **współautorem 51 posterów i 4 prezentacji ustnych** prezentowanych podczas konferencji naukowych. Jestem **wykonawcą w 3 grantach**. Zostałam **czterokrotnie nagrodzona** przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, **raz Nagrodą Zespołową i trzykrotnie Nagrodą Indywidualną**. Brałam udział w **trzech zagranicznych stażach naukowych** (Ukraina, Republika Czeska i Izrael). Jeden z tych staży naukowych był efektem zwycięstwa w konkursie organizowanym przez Fundację ProRegio. Ponadto byłam **nominowana do nagrody** w konkursie Prox Galien Polska. Recenzowałam **39 publikacji**, w większości

zgłaszanych do czasopism naukowych i zasięgu międzynarodowym. Współpracuję z **16 jednostkami**: 7 naukowymi jednostkami zagranicznymi, 3 krajowymi jednostkami naukowymi oraz 5 jednostkami naukowymi wywodzącymi się z uczelni macierzystej (UMP) oraz z jedną firmą. Brałam udział w różnorodnych kursach i szkoleniach, dotyczących np. nowoczesnych metod monitorowania procesów chemicznych, ochrony własności intelektualnej, technik zaawansowanej syntezy organicznej, najnowszych osiągnięć w szkolnictwie wyższym i kursie podwyższającym biegłość języka angielskiego.

7. Oferta naukowa doktora habilitowanego skierowana do członków Rady

W dzisiejszych czasach priorytetowym zadaniem dla wielu naukowców jest poszukiwanie nowych możliwości chemicznych modyfikacji związków naturalnych o znanych kierunkach aktywności farmakologicznej, prowadzących do nowych, przyszłościowych związków o wysokiej efektywności. Wśród licznych trendów syntezy organicznej szczególną uwagę naukowców przyciąga dimeryzacja. Wynikiem takiego działania jest otrzymanie interesujących połączeń strukturalnych dobrze poznanych aktywnych monomerów. Dimeryzacja jest specyficznym typem chemicznej modyfikacji zarówno związków naturalnych, jak i syntetycznych. Spośród szerokiego spektrum związków dimerycznych, dimery triterpenowe nie są zbyt dobrze poznaną grupą pochodnych, toteż zdecydowałam się rozwinąć tę drogę chemicznych modyfikacji. Połączenie dwóch jednakowych lub różnych triterpenowych jednostek monomerycznych i dalsze chemiczne modyfikacje otrzymanych dimerów skutkować będą otrzymaniem nowych substancji o przypuszczalnej, bądź nowej, dotąd nieznannej, strukturze i parametrach fizykochemicznych oraz o potencjalnych nowych, interesujących właściwościach biologicznych.

Chemiczny panel mojej Oferty naukowej zawiera różne typy chemicznych modyfikacji struktury triterpenowej, w wyniku której uzyskane zostaną dimery. Zaplanowane związki tego typu zostaną otrzymane z wykorzystaniem grup funkcyjnych już obecnych w cząsteczce triterpenu, lub poprzez nowo wprowadzone ugrupowania. Dodatkowe przekształcenia chemiczne zostaną przeprowadzone przed lub po reakcji dimeryzacji. Porównane zostaną różne drogi syntezy dimerów. Zbadane zostanie zastosowanie różnych

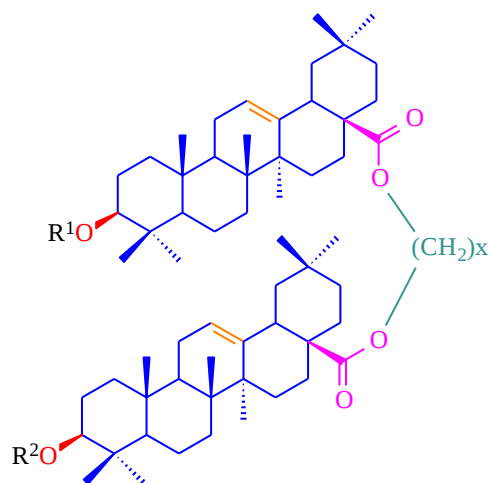
dodatkowych małych cząsteczek, odgrywających funkcję łącznika (linkera) dwóch jednostek monomerycznych. Ocenione zostaną właściwości fizyko-chemiczne i farmakologiczne otrzymanych dimerów. Jest bardzo prawdopodobne, że połączenie dwóch cząsteczek o znanym poziomie aktywności farmakologicznej prowadzić będzie do uzyskania związku bardziej aktywnego lub/ oraz bardziej selektywnego. Badania biologiczne zostaną przeprowadzone w kooperacji z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Przeprowadzona zostanie analiza zależności struktura-aktywność. Poszukiwane będą również nowe, przyszłościowe, użytkowe właściwości triterpenowych pochodnych dimerycznych, np. zdolność do tworzenia żeli, co pozwoli zastosować takie dimery w różnych dziedzinach nauki.

Przeprowadzone wstępne badania chemiczne, dotyczące łączenia dwóch cząsteczek kwasu oleanolowego poprzez grupę C-17 karboksylową z zastosowaniem wybranych linkerów, pozwoliły opracować metodę syntezy pochodnych dimerycznych. Obecnie przeprowadzane są syntezy dimerów kwasu oleanolowego z zastosowaniem nierozgałęzionych α,ω -dibromowęglowodorów o różnej długości łańcucha. Ogólna struktura takich dimerów przedstawiona jest na **Rys. 13**. Ponieważ reakcje takie zachodzą w podobnych warunkach (rozpuszczalnik, proporcje molowe reagentów, temperatura), interesujące jest, na ile podobne (bądź różne) będą czasy takich reakcji oraz jakie będą ich wydajności. Interesujące jest również, jak długość linkera (liczba „x”, **Rys. 13**) będzie wpływać na właściwości fizykochemiczne otrzymanego dimeru, tj. na zdolność do krystalizacji, na temperaturę topnienia surowego/krystalizowanego/wytrąconego dimeru, jego skręcalność optyczną, rozpuszczalność w różnych rozpuszczalnikach, zdolność do tworzenia żeli i inne.

Otrzymane dimery zawierają w cząsteczce dwa wiązania nienasycone pomiędzy atomami C-12 i C-13, jak również dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C-3, zatem będzie można przeprowadzić liczne chemiczne przekształcenia. Jednym z nich jest acylowanie grupy C-3 hydroksylowej. Reakcja taka pozwala wprowadzić do cząsteczki triterpenu różne grupy o charakterze farmakoforu, np. resztę kwasu bursztynowego, dimetylobursztynowego, nikotynowego i wielu innych.

Planowane syntezy generują coraz to kolejne pytania, np. czy jest możliwe wprowadzenie do cząsteczki dimeru **tylko jednej** grupy acylowej? Jeśli tak, jak można

przekształcić drugą, niezmienioną grupę hydroksylową? Czy można do cząsteczki dimeru wprowadzić **dwie różne** grupy acylowe? Albo **dwie inne** grupy funkcyjne (nie acylowe), ale **niejednakowe**? Czy w przypadku połączenia dwóch jednostek monomerycznych krótkim linkerem, np. jednowęglowym, zaistnieją przeszkody steryczne? Jak jest położenie jednej jednostki triterpenowej w cząsteczce dimeru w stosunku do drugiej? Czy jest możliwe otrzymanie dimeru składającego się z **dwóch różnych jednostek triterpenowych**? Jak otrzymać kolejne typy dimerów triterpenowych unikając wieloetapowego zestawu reakcji?



Rys. 13. Ogólna struktura dimerów otrzymanych z kwasu oleanolowego poprzez ugrupowanie $-\text{COOH}$.

Pierwszą grupę dimerów kwasu oleanolowego, w których dwie cząsteczki powyższego triterpenu są połączone krótkim łącznikiem, przekazano do badań na aktywność przeciwnowotworową; testy zostaną przeprowadzone w Uniwersytecie Martina Lutra w Halle-Wittenberg. Badania zostaną wykonane pod kierownictwem Prof. Rene Csuka.

Dane literaturowe, dotyczące chemicznych transformacji triterpenów, prowadzących do uzyskania pochodnych o charakterze dimerów zebrano i zaprezentowano w postaci pracy przeglądowej, opublikowanej w *Current Medicinal Chemistry* (Załącznik 4, pozycja II/A/1).

B. Czujmar