

AUTOREFERAT

**SYNTEZA, USTALENIE BUDOWY I BADANIA WŁAŚCIWOŚCI  
BIOLOGICZNYCH GLIKOZAMINOZYDÓW DIOSGENYLU**

**Henryk Myszka**

UNIWERSYTET GDAŃSKI, WYDZIAŁ CHEMII

GDAŃSK 2018

## 1. Imię i nazwisko: Henryk Myszka

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- 1987 r. – stopień doktora nauk chemicznych, Uniwersytet Gdański, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii  
Rozprawa doktorska – „Budowa i właściwości produktów reakcji chlorków *O*-acetylo-2-deoksy-2-nitrozo-*D*-glikopiranozyli z pirazolem i pochodnymi hydroksyaminokwasów” – promotor, prof. dr hab. Zygfryd Smiatacz.
- 1982 r. – tytuł zawodowy magistra, Uniwersytet Gdański, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

<i>Stanowisko</i>	<i>Okres</i>	<i>Jednostka</i>
Studium Doktoranckie chemik	1982 - 1986	Instytut Chemii, Uniwersytet Gdański
asystent	1986 - 1987	Instytut Chemii, Uniwersytet Gdański
asystent naukowy	1987 - 1991	Instytut Chemii, Uniwersytet Gdański
adiunkt	1989 - 1991	Instytut Farmakologii, Uniwersytet Tennessee w Memphis (USA)
st. wykładowca	1991 - 2010	Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
	01.10.2010 →	Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

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

A) Tytuł osiągnięcia naukowego: **Synteza, ustalenie budowy i badania właściwości biologicznych glikozaminozydów diosgenylu**

B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

- H-01. D. Bednarczyk, W. Kaca, **H. Myszka\***, L. Serwecińska, Z. Smiatacz, A. Zaborowski  
*The synthesis of diosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranoside hydrochloride.*  
Carbohydr. Res., **328** (2000) 249-252. (IF<sub>2000</sub> = 1,606; IF<sub>2017</sub> = 2,074)  
*Kierowałem projektem badań własnych obejmującym temat tej pracy. Zaplanowałem otrzymanie opisanych związków oraz współuczestniczyłem w ich syntezie, wykonując niektóre eksperymenty wg wcześniej opracowanych procedur. Uczestniczyłem w ustalaniu ich budowy, interpretacji wyników oraz w redagowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 75%.*
- H-02. **H. Myszka\***, D. Bednarczyk, Z. Ciunik, W. Kaca  
*<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and X-ray diffraction data for a diosgenyl N,O-protected glucopyranoside.*  
Magn. Reson. Chem., **40** (2002) 231-236. (IF<sub>2002</sub> = 0,994; IF<sub>2017</sub> = 1,776)

*Kierowałem projektem badań obejmującym temat tej pracy. Byłem współpomysłodawcą tej publikacji. Zaplanowałem przeprowadzenie badań krystalograficznych na Uniwersytecie Wrocławskim. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pomocy w szczegółowej interpretacji widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, współpracy przy opracowaniu treści publikacji i interpretacji wyników. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

- H-03. **H. Myszka\***, D. Bednarczyk, M. Najder, W. Kaca  
*Synthesis and induction of apoptosis in B cell chronic leukemia by diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside hydrochloride and its derivatives.*  
Carbohydr. Res., **338** (2003) 133-141. (IF<sub>2003</sub> = 1,533; IF<sub>2017</sub> = 2,074)  
*Kierowałem jednym z projektów naukowych obejmujących temat pracy. Zaplanowałem od strony chemicznej syntezę opisywanych związków oraz brałem czynny udział w ich syntezie. Uczestniczyłem w planowaniu badań biologicznych otrzymanych saponin. Również brałem udział w ustalaniu ich budowy na podstawie widm NMR oraz w opracowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 55%.*
- H-04. O. Cirioni, **H. Myszka**, M. Dawgul, R. Ghiselli, F. Orlando, C. Silvestri, L. Brescini, W. Kamysz, M. Guerrieri, A. Giacometti  
*In vitro activity and in vivo efficacy of the saponin diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside hydrochloride (HSM1) alone and in combination with daptomycin and vancomycin against Gram-positive cocci.*  
J. Med. Microbiol., **60** (2011) 1337-1343. (IF<sub>2011</sub> = 2,502; IF<sub>2017</sub> = 2,112)  
*Kierowałem projektem naukowo-badawczym dotyczącym badań tytułowego chlorowodoru. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zrealizowaniu wieloetapowej syntezy chemicznej tytułowej saponiny, ustaleniu jej budowy, oczyszczeniu w stopniu wymaganym do badań przeciwdrobnoustrojowych i przekazanie do badań biologicznych we Włoszech. Uczestniczyłem także w redagowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*
- H-05. D. Bednarczyk, **H. Myszka\***  
*Ostony grupy aminowej w D-glukozaminie.*  
Wiad. Chem., **55** (2001) 491-515.  
*Praca o charakterze przeglądowym obejmująca także doniesienia literaturowe dotyczące moich wcześniejszych wyników związanych ze stosowaniem osłon funkcji aminowej. Byłem pomysłodawcą tej pracy i zaplanowałem jej tematykę. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współuczestnictwie w zgromadzeniu literatury dotyczącej osłon grupy aminowej w D-glukozaminie oraz w opracowaniu tekstu i rysunków publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*
- H-06. **H. Myszka\***, D. Bednarczyk  
*Saponiny steroidowe.*  
Wiad. Chem., **59** (2005) 491-515.  
*Praca przeglądowa charakteryzująca saponiny, także zawierające resztę D-glukozaminy. Byłem współpomysłodawcą tej publikacji. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pomocy w zgromadzeniu literatury dotyczącej podziału saponin, wybranych metod ich syntezy oraz właściwości biologicznych. Uczestniczyłem w opracowaniu manuskryptu i rysunków. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*
- H-07. D. Bednarczyk, A. Walczewska, D. Grzywacz, A. Sikorski, B. Liberek, **H. Myszka**  
*Differently N-protected 3,4,6-tri-O-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl chlorides and their application in the synthesis of diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside.*  
Carbohydr. Res., **367** (2013) 10-17. (IF<sub>2013</sub> = 1,966; IF<sub>2017</sub> = 2,074)

*Byłem kierownikiem tematu/zadania obejmującego tematykę tej pracy. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu syntezy różnorodnych donorów glikozyłu i syntezie chemicznej kilku z nich. Również uczestniczyłem w ustalaniu budowy niektórych związków, głównie glikozydów diosgenyłu. Także brałem udział w przygotowaniu treści manuskryptu, rysunków i interpretacji wyników. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

- H-08. A. Walczewska, D. Grzywacz, D. Bednarczyk, M. Dawgul, A. Nowacki, W. Kamysz, B. Liberek, **H. Myszka**

*N-Alkyl derivatives of diosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranoside; synthesis and antimicrobial activity.*

Beilstein J. Org. Chem., **11** (2015) 869-874. (IF<sub>2015</sub> = 2,697; IF<sub>2017</sub> = 2,330)

*Kierowałem tematem wchodzącym w skład projektu naukowo-badawczego dotyczącego badań opisanych w tej pracy. Byłem współpomysłodawcą syntezy i badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współplanowaniu metod syntezy różnorodnych donorów glikozyłu, sposobu ich sprzęgania z diosgeniną a potem modyfikacji funkcji aminowej poprzez jej N-alkilowanie i N,N-dialkilowanie. Również uczestniczyłem w syntezie niektórych związków i ustaleniu ich budowy. Także brałem udział w przygotowaniu treści manuskryptu, rysunków, interpretacji wyników. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

- H-09. M.A. Dawgul, D. Grzywacz, B. Liberek, W. Kamysz, **H. Myszka**

*Activity of diosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranoside, its hydrochloride, and N,N-dialkyl derivatives against non-albicans Candida isolates.*

Med. Chem., **14** (2018) 460-467. (IF<sub>2017</sub> = 2,631)

*Byłem współpomysłodawcą napisania tej publikacji. Kierowałem tematem wchodzącym w skład projektu naukowo-badawczego dotyczącego badań opisanych w tej pracy. Mój wkład jej w powstanie polegał na pomocy w syntezie N,N-dialkilowych pochodnych D-glukozaminy diosgenyłu, ich oczyszczaniu, potwierdzeniu budowy na podstawie widm NMR. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu tej publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 45%.*

- H-10. **H. Myszka\***, P. Sokołowska, A. Cieślińska, A. Nowacki, M. Jaśkiewicz, W. Kamysz, B. Liberek

*Diosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-D-galactopyranoside: synthesis, derivatives and antimicrobial activity.*

Beilstein J. Org. Chem., **13** (2017) 2310-2315. (IF<sub>2017</sub> = 2,330)

*Byłem pomysłodawcą syntezy i badań opisywanych w tej publikacji. Również kierowałem tematem wchodzącym w skład projektu naukowo-badawczego dotyczącego tematyki pracy. Mój wkład w jej powstanie polegał na zaplanowaniu syntezy donora galaktozaminopiranozylowego, jego warunków sprzęgania z diosgeniną oraz zaplanowaniu pochodnych podstawowej saponiny. Uczestniczyłem w syntezie większości związków, ich oczyszczaniu, ustaleniu budowy (rozwiązaniu widm NMR) i przygotowaniu do badań przeciwdrobnoustrojowych. Przygotowałem podstawową wersję manuskryptu, rysunki i zinterpretowałem uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

\* autor korespondencyjny

Sumaryczny Impact Factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi: **IF<sub>rok opubl. pracy</sub> = 16,259; IF<sub>2017</sub> = 17,401**. Średnia wartość IF w przeliczeniu na jedną pracę z listy JCR wynosi odpowiednio **2,032 i 2,175**.

Oświadczenia habilitanta dotyczące udziału w pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się również w załączniku 5.

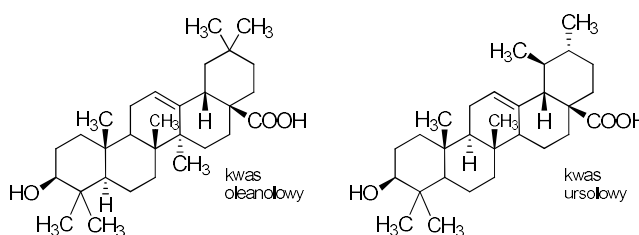
Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 6.

C) Omówienie celu naukowego prac wymienionych w punkcie 4. B) i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

### Synteza, ustalenie budowy i badania właściwości biologicznych glikozaminozydów diosgenolu

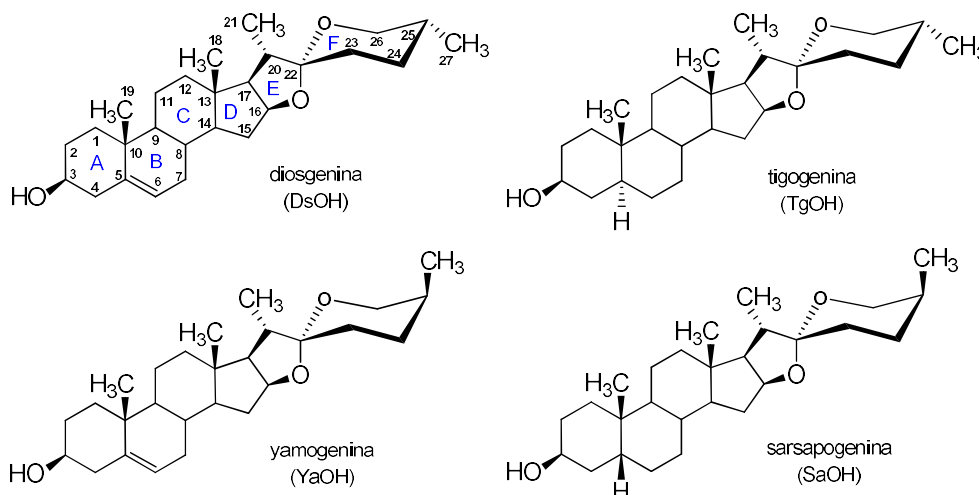
#### I. Wstęp

Saponiny to zróżnicowana pod względem strukturalnym grupa glikozydów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, głównie w królestwie roślin, ale można je także znaleźć w niektórych organizmach morskich. Tworzą piany mydlane podczas ich mieszania z wodą i są wykorzystywane m.in. jako detergenty, środki pieniające oraz emulgatory.<sup>[1,2]</sup> Najczęściej spotykanymi saponinami naturalnymi są saponiny triterpenoidowe i steroidowe. W glikozydach triterpenoidowych aglikonem są zazwyczaj reszty kwasu oleanolowego lub ursolowego (Rys. 1).<sup>[3]</sup>



Rys. 1.

Z kolei wśród glikozydów steroidowych wyróżnia się saponiny cholestanowe, furostanowe i spirostanowe. Saponiny należące do ostatniej klasy są szczególnie ważną grupą z uwagi na szerokie spektrum właściwości biologicznych. W tej grupie aglikon, czyli tzw. sapogeninę, stanowi 27-węglowy układ o strukturze 16,22:22,26-diepoksycholestanu. Poszczególne sapogeny różnią się obecnością wiązań podwójnych, np. C<sub>5</sub>=C<sub>6</sub>, ułożeniem grupy metylowej przy węglu C<sub>25</sub> (25*R* lub 25*S*) i niekiedy dodatkowymi grupami funkcyjnymi, np. –OH. Naturalne sapogeny spirostanowe to m.in. diosgenina, yamogenina, tigogenina i sarsapogenina (Rys. 2).<sup>[3,4]</sup>



Rys. 2.

Fragment hydrofilowy saponin składa się zwykle z jednej lub kilku jednostek cukrowych. Najczęściej spotykanymi sacharydami wchodzącymi w ich skład są: D-glukoza (D-Glc), D-galaktoza (D-Gal), L-ramnoza (L-Rha) i D-ksyloza (D-Xyl), tworzące często łańcuchy di-, tri- i tetrasacharydowe. W naturalnych saponinach pierwszą jednostką cukrową przyłączoną do aglikonu jest najczęściej reszta D-glukozy.<sup>[5,6]</sup>

Większość saponin została wyodrębniona z preparatów ziołowych stosowanych w medycynie ludowej, szczególnie w krajach Azji. W postaci ekstraktów ziołowych, maści, różnego rodzaju naparów są tam stosowane jako leki przeciw malarii, kile, odtrutki przeciwko jadom węży i owadów oraz jako środki antyseptyczne, bakteriobójcze i przeciwwirusowe.<sup>[7]</sup> Zainteresowanie właściwościami preparatów medycyny ludowej spowodowało, że zaczęto izolować, identyfikować i badać ich składniki. Przełomowym momentem było wykazanie w latach 60-tych ubiegłego wieku właściwości przeciwnowotworowych ekstraktu z chińskiego preparatu *Yunnan Baiyao*.<sup>[8]</sup> W następnych latach przeprowadzono liczne badania przedstawicieli tej klasy związków w celu znalezienia nowych preparatów przydatnych w zwalczaniu komórek nowotworowych.<sup>[9-12]</sup> Związkami wykazującymi działanie przeciwnowotworowe okazały się m.in. glikozydy diosgenyłu, w tym dioscyna, tj.  $O\text{-}\{\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}[\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{2)}]\text{-}\beta\text{-D-Glc}\}\text{-diosgenina}$  i gracylina, czyli  $O\text{-}\{\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}[\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{2)}]\text{-}\beta\text{-D-Glc}\}\text{-diosgenina}$  oraz ich analogi.<sup>[13-15]</sup>

Diosgenina jest jedną z najważniejszych z punktu widzenia farmaceutycznego sapogenin steroidowych. Występuje głównie w rodzinie roślin pochrzynowatych (*Dioscoreaceae*), a także w niektórych gatunkach roślin psiankowatych (*Solanaceae*) i bobowatych (*Fabaceae*). Spośród roślin występujących w Polsce diosgeninę znaleziono m.in. w nasionach kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) i kozieradki błękitnej (*Trigonella caerulea*).<sup>[3]</sup> Ponieważ saponiny diosgeniny wykazują szerokie spektrum właściwości biologicznych, trwają prace nad izolowaniem tych związków z materiału roślinnego jak i nad metodami ich syntezy chemicznej.<sup>[3-6]</sup>

Za celowością prowadzenia syntez glikozydów (25*R*)-spirost-5-en-3β-yłu, tj. diosgeniny, przemawia przede wszystkim fakt, że daje ona ogromne możliwości uzyskania analogów nie występujących naturalnie. Metodami chemicznymi można modyfikować cząsteczkę glikozydu, na przykład przez przyłączenie innej jednostki cukrowej, modyfikację istniejących grup funkcyjnych bądź wprowadzenie nowych. Tego rodzaju modyfikacje stwarzają możliwości uzyskania wielu nowych związków, często o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych w porównaniu do substancji macierzystych.<sup>[16-22]</sup>

Bardzo często chorobie nowotworowej towarzyszy upośledzenie systemu odpornościowego czego następstwem jest duża podatność na wszelkiego rodzaju infekcje, w tym bakte-

ryjne i grzybicze. Z kolei w zwalczaniu infekcji bakteryjnych i grzybiczych duże znaczenie ma penetracja leków do wnętrza komórek. Kluczowe znaczenie dla efektywnego działania może być związane z substancjami ułatwiającymi wnikanie farmaceutyków do komórek drobnoustrojów. Wówczas takie związki umożliwiają, poprzez zmiany w ich ścianie komórkowej, podwyższenie efektywnego stężenia leków wewnątrz komórek. Substancjami o takim działaniu mogą być saponiny, w tym glikozydy diosgenyłu.<sup>[23,24]</sup>

Szczegółowa wiedza na temat właściwości glikozydów diosgenyłu oraz metod syntezy glikozydów<sup>[25-27]</sup>, ze szczególnym uwzględnieniem metod syntezy glikozydów 2-amino-2-deoksy cukrów<sup>[28]</sup> pozwoliła mi zaprojektować serię syntez mających na celu połączenie dwóch aminocukrów (D-glukozaminy i D-galaktozaminy) z diosgeniną. Zsyntezowane D-glikozaminozydy diosgenyłu poddałem szeregu modyfikacjom, otrzymując ich pochodne *N*-acylowe, 2-ureidowe, *N*-alkilowe oraz *N,N*-dialkilowe. Uzyskane saponiny zostały przebadane pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej i/lub przeciwdrobnoustrojowej (bakterie i grzyby).

W literaturze chemicznej o zasięgu międzynarodowym (wg JCR) dostępnych jest zaledwie 15 publikacji poświęconych budowie i właściwościom glikozaminozydów diosgenyłu, z tego 10 prac pochodzi z Wydziału Chemii UG, których jestem współautorem.

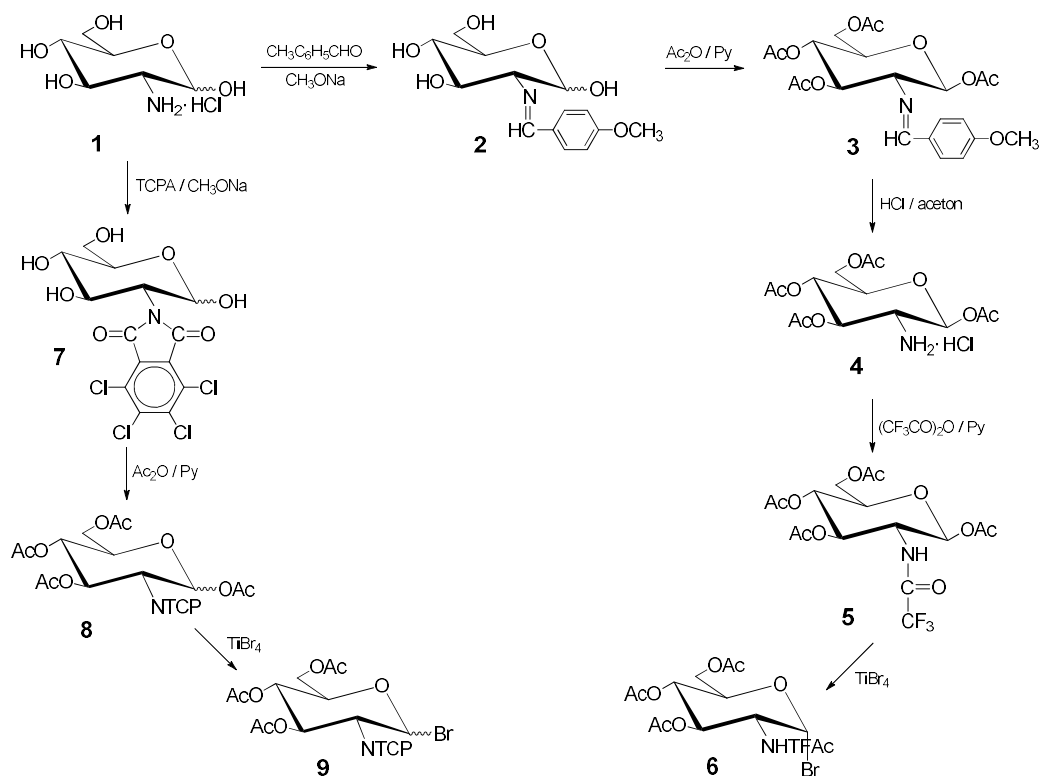
## **II. Pierwsze syntezy i badania 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu – [H-01] i [H-02]**

W naturalnym środowisku, jak do tej pory, nie znaleziono saponin spirostanowych zawierających reszty D-glukozaminy. Nikt wcześniej nie podjął się również syntezy takich glikozydów. Założyłem, że wymiana typowej dla saponin reszty D-glukozy na resztę D-glukozaminy może wpłynąć korzystnie na właściwości glikozydu, a grupa aminowa oraz możliwości jej modyfikacji pozwolą na pozyskanie ciekawych, potencjalnie aktywnych pochodnych.

Pierwszą syntezę D-glukozaminozydu diosgenyłu przeprowadziłem w drugiej połowie lat 90-tych XX w. Substratami wyjściowymi do syntezy tej saponiny były chlorowodorek D-glukozaminy (**1**) i diosgenina (Schemat 1). Do zabezpieczenia grupy  $-NH_2$  wybrałem osłonę trifluoroacetylową i tetrachloroftaloilową. Wyniki badań wraz z informacją o samodzielnej aktywności cytostatycznej okazały się na tyle interesujące, iż postanowiłem zgłosić je do opatentowania, co znalazło swoje odzwierciedlenie w dwóch zgłoszeniach patentowych, a potem je opublikowałem [**H-01**].

Adaptując znane w literaturze sekwencje reakcji polegających na założeniu osłony *p*-metoksybenzylidenowej na grupę aminową (**2**), acetylowaniu (**3**), usunięciu osłony benzylidenowej (**4**), wprowadzeniu osłony trifluoroacetylowej na grupę aminową (**5**) i bromowaniu przy

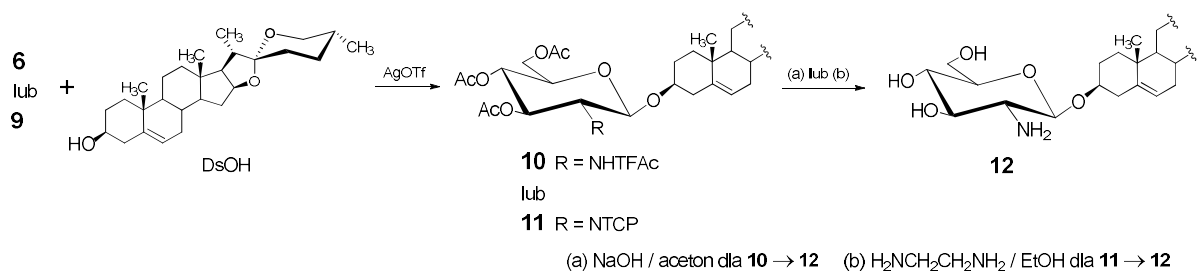
użyciu  $\text{TiBr}_4$  uzyskanej pochodnej, otrzymałem bromek 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-glukopiranozyłu (**6**) [H-01].



Schemat 1.

W zbliżony sposób zsyntezowałem drugi donor glikozyłu, acylując najpierw chlorowodorek **1** bezwodnikiem tetrachloroftalowym (TCPA), potem bezwodnikiem octowym w pirydynie – uzyskałem octan **8** ( $\alpha/\beta$ ), a z niego mieszaninę anomeryczną bromków **9**, stosując również  $\text{TiBr}_4$  jako odczynnik bromujący.

W pracy [H-01] opisałem także kondensację bromków **6** i **9** z diosgeniną, którą prowadziłem według zmodyfikowanej metody Koenigsa-Knorra wybierając jako promotor reakcji triflan srebra. Zastosowanie tej procedury gwarantowało uzyskanie glikozydu o konfiguracji  $\beta$ , a więc analogicznej do występującej w saponinach naturalnych. Produktami reakcji donorów **6** i **9** z diosgeniną są odpowiednio saponiny **10** i **11**. Jednak reakcje sprzęgania tych donorów z DsOH przebiegały zaledwie z  $\sim 65\%$  wydajnością (Schemat 2).

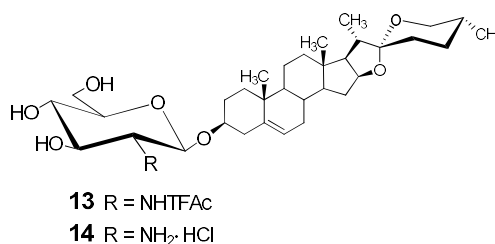


Schemat 2.



Budowę glikozydów każdorazowo ustalałem na podstawie widm NMR, wykorzystując dwuwymiarową spektroskopię korelacyjną (COSY) oraz technikę pozwalającą na korelowanie sygnałów protonów z sygnałami jąder atomów węgla (HSQC). Stała sprzężenia pomiędzy aksjalnie zorientowanymi protonami H-1 i H-2 wynosząca  $J_{1,2} = 8,4 \div 10$  Hz wskazuje na ekwatorialną orientację aglikonu w saponinach **10** i **11**.

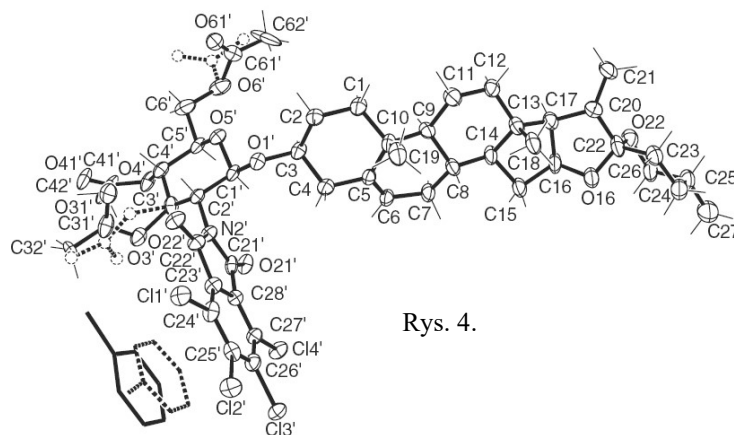
Do deprotekcji wszystkich grup w saponinie **10** zastosowałem wodny roztwór NaOH w acetonie, a w **11** roztwór hydratu hydrazyny lub etylenodiaminy w etanolu, uzyskując każdorazowo saponinę **12**, tj. 3-O-(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeninę. W przypadku stosowania etylenodiaminy produktem ubocznym była *N*-acetylowa pochodna. Z kolei do usunięcia tylko grup *O*-acetylowych w **10** zastosowałem metanolan sodu w metanolu, otrzymując saponinę **13** (Rys. 3)



Rys. 3.

z grupą trifluoroacetamidową przy atomie węgla C-2. Z glukozaminozydu **12** w reakcji z roztworem HCl w metanolu uzyskałem chlorowodorek **14**. Wstępne badania przeciwnowotworowe chlorowodoru **14** polegały na określeniu jego wpływu na limfocyty wyizolowane z krwi pacjentów cierpiących na chłoniaka a leczonych 2-chlorodeoksyadenozyną (2-CDA, kładrybina). Saponina **14** wykazuje cytotoksyczność wobec tych limfocytów. Dodatkowo, **14** wzmacnia efekt cytostatyczny 2-CDA, znacząco redukując (20÷30%) liczbę limfatycznych komórek rakowych.

W kolejnej pracy [H-02] opublikowałem po raz pierwszy rezultaty pomiarów krystalograficznych osłoniętego D-glukozaminozydu **11**, uzyskanego w wyniku krystalizacji z mieszaniny toluen/octan etylu (Rys. 4). Dane potwierdziły, iż pierścień piranowy występuje w konformacji krzesłowej <sup>4</sup>C<sub>1</sub> z wszystkimi podstawnikami zorientowanymi ekwatorialnie. Także pokazały one, że ta saponina współkrystalizuje z jedną molekułą toluenu, która w sieci krystalicznej jest umiejscowiona pomiędzy pierścieniem aromatycznym grupy tetrachloroftalimidowej a pierścieniem piranowym reszty diosgeniny. Pierwsze z wymienionych oddziaływań jest typu  $\pi$ - $\pi$  a drugie, wg obliczeń, wskazuje, że między obydwo-

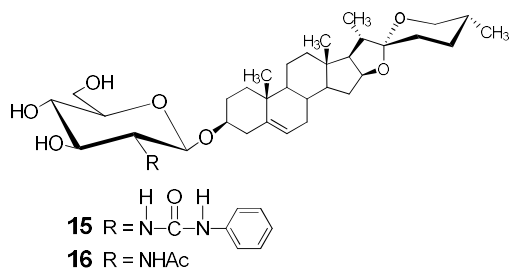


Rys. 4.

z pierścieniami występuje słabe wiązanie wodorowe C-H...Ph [H-02].

### III. Właściwości chlorowodoru 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu i 2-fenyloureidowej pochodnej – [H-03] i [H-04]

W dalszej swojej pracy, równoległe z doskonaleniem metod syntezy D-glukozaminozydów diosgenyłu, prowadziłem reakcje pozwalające uzyskać nowe pochodne oraz kontynuowałem badania dotyczące oceny ich aktywności przeciwnowotworowej. Efektem tego było otrzymanie dwóch nowych saponin pochodzących od D-glukozaminozydu diosgenyłu **12**. Były to pochodne 2-fenylomocznikowa (**15**) i *N*-acetylowa (**16**) (Rys. 5) opisane w pracy [H-03]. Saponinę **15** otrzymałem metodą stosowaną w syntezie mocznikowych po-



Rys. 5.

chodnych, a polegającą na bezpośredniej reakcji związku **12** z izocyjanianem fenylu. Z kolei *N*-acetylową (**16**) i *N*-trifluoroacetylową (**13**) pochodną uzyskałem w reakcji acetylowania saponiny **12** odpowiednim bezwodnikiem w metanolu lub pirydynie.

W tej pracy po raz pierwszy do syntezy saponiny **11** zastosowałem jako donor glikozyłu mniej reaktywny chlorek 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-terachloro-ftalimido- $\beta$ -D-glukopiranozyłu. Jednak to nie wpłynęło w istotny sposób na poprawę wydajności reakcji (67%) [H-03].

Dla chlorowodoru **14** i 2-fenylomocznikowej pochodnej **15** wykonano badania aktywności przeciwnowotworowej mającej na celu określenie ich samodzielnego wpływu oraz w połączeniu każdego z nich z 2-chlorodeoksyadenozyną (2-CdA, kladrybina) na indukowanie apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych pochodzących od pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną B-komórkową (PBL-B), co również opisałem w pracy [H-03]. Kladrybina jest jednym z preparatów używanych w praktyce klinicznej w leczeniu tego nowotworu. Jej działanie polega na wywieraniu efektu cytotoksycznego na limfocyty proliferujące (replikujące DNA) jak i na limfocyty nie dzielące się, ale stanowiące dużą część masy guza. Kladrybina jest toksyczna zarówno wobec limfocytów nowotworowych jak i zdrowych, jej podanie prowadzi m.in. do redukcji ich ogólnej liczby. O ile apoptoza jest procesem całkowicie kontrolowanym przez komórkę, szybkim i nie wywołującym stanu zapalnego to nekroza (martwica) jest śmiercią przypadkową, wynikającą z nagłego uszkodzenia komórki przez dużą dawkę szkodliwych czynników. Ponieważ podobnie do 2-CdA zachowuje się wiele innych cytostatyków to celowe i konieczne są poszukiwania nowych skuteczniejszych leków, które będzie cechowała niższa toksyczność wobec komórek zdrowych.

Do naszych badań biologicznych została pobrana krew obwodowa pochodząca od 27

pacjentów chorych na PBL-B z progresywną lub objawową postacią choroby. Limfocyty były inkubowane samodzielnie lub z pochodnymi diosgeniny **14**, **15** i/lub z 2-CdA, a procent komórek apoptycznych i nekrotycznych oznaczano metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki badań wskazują na bardzo heterogeniczną populację pacjentów nie wykazującą określonej zależności. Liczba komórek apoptycznych, przy inkubowaniu limfocytów B z saponinami **14** i **15** oddzielnie, czy też w połączeniu 2-CdA z każdą z saponin, zmienia się od kilku procent aż do 61,3%, a liczba komórek nekrotycznych w zakresie od 0,2 do 38,8%. Dla próby kontrolnej i dla 2-CdA te wartości były zbliżone. Zwiększenie lub zmniejszenie procesu apoptozy i nekrozy zależało od badanej próbki. Tylko u kilku chorych zaobserwowano znaczne (< 50%) obniżenie liczby komórek nowotworowych podczas inkubacji z testowanymi glikozydami w obecności kladrybiny, co świadczy o tym, że badane saponiny prawdopodobnie ułatwiają wnikanie leku do wnętrza komórki nowotworowej.

Opublikowane przeze mnie wyniki zainspirowały także innych badawczy do podjęcia niezależnych prac nad pochodnymi D-glukozaminy diosgeniny.<sup>[29-33]</sup> Autorzy tych pięciu prac glikozylowali diosgeninę tzw. *donorem Schmidta*, tj. per-O-acetylowanym trichloroacetimidanem D-glukozaminy posiadającym różne osłony na funkcji aminowej. Otrzymane saponiny poddawali badaniom na różnych liniach komórek nowotworowych a swoje wyniki porównywali m.in. w stosunku do doksorubicyny i 5-fluorouracylu.

Z kolei uzyskiwane przez nas wyniki pozwoliły na rozszerzenie współpracy z innymi ośrodkami naukowymi i tym samym poszerzenie badań o aktywność przeciwbakteryjną podstawowego D-glukozaminy. I tak, we współpracy z Uniwersytetem Politechnicznym w Ankonie (Włochy) powstała w 2011 r. praca **[H-04]**, opisująca wyniki naszych badań *in vitro* i *in vivo* dla chlorowodoru 2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu diosgeniny (**14**).

W tej pracy prowadziliśmy ocenę jego cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych raka płuc człowieka A549 i nie stwierdziliśmy jej w stosunku do komórek tej linii (wynosiła zaledwie 3,5%).

Kolejne badania *in vitro* opisane w pracy **[H-04]** przeprowadziliśmy na szczepach bakterii Gram-dodatnich, ustalając dla glikozydu **14** minimalne stężenie hamujące w 50% i 90% (MIC<sub>50</sub> i 90) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC<sub>50</sub> i 90). Do badań stosowaliśmy zarówno szczepy referencyjne bakterii jak i szczepy pochodzące od pacjentów leczonych w warunkach szpitalnych. Badania prowadziliśmy dla szczepów metycylino- i wankomycyno-opornych (odpowiednio MR i VR) oraz metycylino- i wankomycyno-wrażliwych (MS i VS) gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i paciorkowca kałowego (*Enterococcus faecalis*) oraz dla paciorkowca będącego czynnikiem etiologicznym anginy (*Streptococcus*

*pyogenes*) i podobnej do prątka gruźlicy pałeczkowej bakterii *Rhodococcus equi*, bytującej w glebie i będącej patogenem zapalenia płuc u źrebiąt, rzadziej u ludzi. Jako związki kontrolne stosowaliśmy ogólnodostępne antybiotyki, m.in. imipenem, doksycyklinę, erytromycynę, cyprofloksacynę (Tabela 1). Wyniki badań dla chlorowodoru **14** są porównywalne z rezultatami uzyskanymi dla 3-4 wzorcowych antybiotyków.

Tabela 1. Wybrane wartości MIC<sub>50</sub> (MIC<sub>90</sub>) oraz MBC<sub>50</sub> (MBC<sub>90</sub>) dla chlorowodoru **14** i referencyjnych antybiotyków względem szczepów szpitalnych bakterii Gram-dodatnich [H-04].

Związek Antybiotyk	MIC <sub>50</sub> (MIC <sub>90</sub> )						MBC <sub>50</sub> (MBC <sub>90</sub> )					
	MR <i>S. aureus</i> (n = 20)*	MS <i>S. aureus</i> (n = 20)	VR <i>E. faecalis</i> (n = 10)	VS <i>E. faecalis</i> (n = 20)	<i>S. pyogenes</i> (n = 20)	<i>R. equi</i> (n = 20)	MR <i>S. aureus</i> (n = 20)	MS <i>S. aureus</i> (n = 20)	VR <i>E. faecalis</i> (n = 10)	VS <i>E. faecalis</i> (n = 20)	<i>S. pyogenes</i> (n = 20)	<i>R. equi</i> (n = 20)
<b>14</b> (HCl)	4 (8)	2 (4)	8 (32)	8 (16)	2 (4)	2 (4)	8 (16)	8 (16)	16 (64)	16 (32)	4 (8)	4 (16)
Imipenem	16 (128)	1 (2)	16 (64)	4 (16)	0,5 (1)	0,25 (1)	64 (256)	4 (8)	64 (128)	16 (64)	1 (4)	8 (32)
Doksycyklina	4 (16)	4 (8)	16 (32)	8 (16)	4 (8)	1 (2)	8 (32)	8 (32)	16 (64)	16 (64)	8 (16)	32 (128)
Erytromycyna	4 (16)	2 (8)	16 (64)	8 (32)	2 (8)	0,5 (2)	32 (128)	16 (64)	32 (128)	16 (128)	8 (32)	32 (64)
Cyprofloksacyna	4 (8)	2 (8)	8 (32)	4 (8)	2 (8)	1 (2)	8 (16)	4 (16)	16 (128)	8 (16)	8 (16)	16 (64)

\* n w nawiasie oznacza liczbę badanych izolatów danej bakterii

Na szczególną uwagę zasługują wyniki MIC i MBC saponiny **14** uzyskane dla metycylino-opornego i metycylino-wrażliwego gronkowca złocistego (MR *S. aureus* i MS *S. aureus*) oraz dla paciorkowca kałowego (VR *E. faecalis* i VS *E. faecalis*). Są one bardzo zbliżone do wartości uzyskanych dla czterech antybiotyków stosowanych w leczeniu pacjentów zakażonych tymi bakteriami. Natomiast wartość minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) wobec *R. equi* dla **14** wynosi 4 µg/ml (50%) oraz 16 µg/ml (90%) i jest znacznie lepsza niż dla wzorcowych antybiotyków. Porównując wartości MIC<sub>90</sub> i MBC<sub>90</sub> dla glikozydu **14** oraz dla erytromycyny można zauważyć, że saponina **14** daje lepsze wyniki niż erytromycyna z wyjątkiem bakterii *R. equi* (MIC<sub>90</sub> = 4 µg/ml).

Z kolei do kontroli jakościowej, w celu ustalenia czasu zabijania (tzw. *time-killing*), wykorzystane zostały szczepy referencyjne ATCC (*American Type Culture Collection*). Saponina **14** zabijała bakterie bardzo szybko, i tak dla gronkowca i paciorkowca kałowego było ono kompletne już po 30 min ekspozycji przy stężeniu 2 × MIC, a dla *R. equi* i *S. pyogenes* odpowiednio po 40 i 20 min przy tym samym stężeniu.

Ponieważ rezultaty uzyskane dla bakterii traktowanych tylko saponiną **14** są statystycznie znaczące w porównaniu z grupą kontrolną, postanowiliśmy zbadać synergizm czyli efekt skojarzonego działania dwóch czynników, tj. saponiny i antybiotyku. Swoje wyniki przedstawiliśmy jako frakcjonowane stężenie hamujące (indeks FIC, *Fractional Inhibitory Concentration*;  $FIC \leq 0,5$  świadczy o synergizmie,  $0,5 < FIC \leq 1,0$  o aktywności addytywnej,  $1,0 \div 4$  efekt obojętny a  $FIC > 4$  obrazuje efekt antagonistyczny). Zaobserwowaliśmy, iż tylko zastosowanie chlorowodoru **14** z wankomycyną oraz **14** z daptomycyną prowadzi do uzyskania efektu synergistycznego wobec szczepów metycylino- i wankomycyno-wrażliwych oraz wobec *R. equi* i paciorkowca *S. pyogenes*. Indeks FIC dla tych szczepów bakterii wahał się w granicach  $0,312 \div 0,458$ . Z kolei dla pozostałych antybiotyków wartość FIC wynosiła  $0,917 \div 2,0$ . W żadnym przypadku nie zaobserwowaliśmy efektu antagonistycznego. [H-04]

Interakcja między saponinami a składnikami ściany komórkowej bakterii nie jest dobrze poznana. Także ich mechanizm działania synergistycznego. Nieprzepuszczalność błony komórkowej odgrywa ważną rolę w odporności na antybiotyki. Jeśli penetracja antybiotyku do cytoplazmy jest zwiększana przez zmiany w przenikalności ściany komórkowej to tym samym wzrasta aktywność czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Innymi słowy, jeżeli odpowiednie dawki chlorowodoru **14** oddziałują ze ścianą komórkową, to prawdopodobnie zwiększają jej przenikalność dla klinicznie stosowanych antybiotyków. Wskazuje to na pozytywną interakcję saponiny **14** z wankomycyną oraz daptomycyną.

Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty synergizmu przeprowadziliśmy badania *in vivo* na albinotycznym szczepie wsobnych myszy BALB/c. Jako antybiotyki referencyjne wybraliśmy wankomycynę i daptomycynę a szczepy bakteryjne, którymi zakażano myszy to MS *S. aureus* i VS *E. faecalis*. W przypadku tych zakażeń określaliśmy liczbę mikroorganizmów tworzących kolonię, tzw. CFU/ml (*colony-forming unit*). Otóż, dla tkanki zakażonej gronkowcem i niepotraktowanej saponiną **14**, daptomycyną bądź wankomycyną wartość CFU/ml wynosiła  $6,7 \cdot 10^7$  i była znacząco wyższa niż, gdy zainfekowaną tkankę potraktowano tylko saponiną **14** ( $CFU/ml = 4,4 \cdot 10^4$ ), daptomycyną ( $CFU/ml = 3,8 \cdot 10^3$ ), bądź wankomycyną ( $CFU/ml = 4,0 \cdot 10^3$ ). Jednak, gdy tę tkankę potraktowano saponiną **14** (1 mg związku/kg masy) plus daptomycyną lub wankomycyną (po 7 mg antybiotyku/kg masy) to wartości CFU/ml wynosiły odpowiednio 17 i 22, a więc są one wielokrotnie niższe niż dla samych antybiotyków. Tak więc, największe bakteryjne zahamowanie uzyskaliśmy dla tkanki zakażonej gronkowcem, która została potraktowana mieszaniną naszej saponiny i antybiotyku. Bardzo zbliżone rezultaty otrzymaliśmy również dla tkanki zakażonej paciorkowcem kałowym.

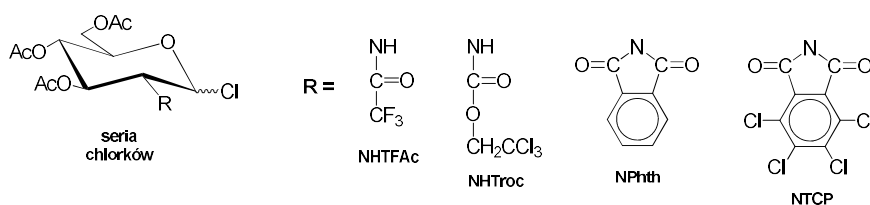
Bardzo dobre rezultaty badań *in vitro* oraz *in vivo* uzyskane dla chlorowodoru **14**,

pokazujące jego hamujący wpływ na wzrost bakterii G<sup>+</sup>, w tym opornych na działanie innych antybiotyków, jednoznacznie dowodzą, iż tego typu połączenia mogą znaleźć zastosowanie jako środki przeciwbakteryjne. Również interakcje tej saponiny z wankomycyną i daptomycyną sugerują, że saponina **14** to obiecujący kandydat do dalszych badań i do poszukiwania pochodnych bądź biokoniugatów.

#### IV. Optymalizacja procedury syntezy 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu – [H-05]÷[H-08]

Uzyskane wyniki dla chlorowodoru **14** i saponiny **15** zainspirowały mnie do kontynuowania prac dotyczących zarówno syntezy jak i właściwości przeciwdrobnoustrojowych 2-amino-2-deoksy-D-glukozydu diosgenyłu. Jednak dalsze prace wymagały udoskonalenia metod jego syntezy, np. przez zastosowanie innych osłon grupy aminowej (acetylowe, pentenylowe, iminowe, karbaminianowe czy imidowe) w cząsteczce D-glukozaminy. Odpowiednio osłonięta grupa aminowa przy atomie węgla C-2 pełni rolę tzw. grupy uczestniczącej w procesie tworzenia wiązania glikozydowego, co gwarantuje uzyskiwanie 1,2-*trans*-glikozydów. Również nie bez znaczenia jest wybór grupy odchodzącej przy anomerycznym atomie węgla. Analiza tych możliwości znalazła swoje odzwierciedlenie w dwóch pracach przeglądowych [H-05] i [H-06] poświęconych tej tematyce, a opublikowanych w Wiadomościach Chemicznych.

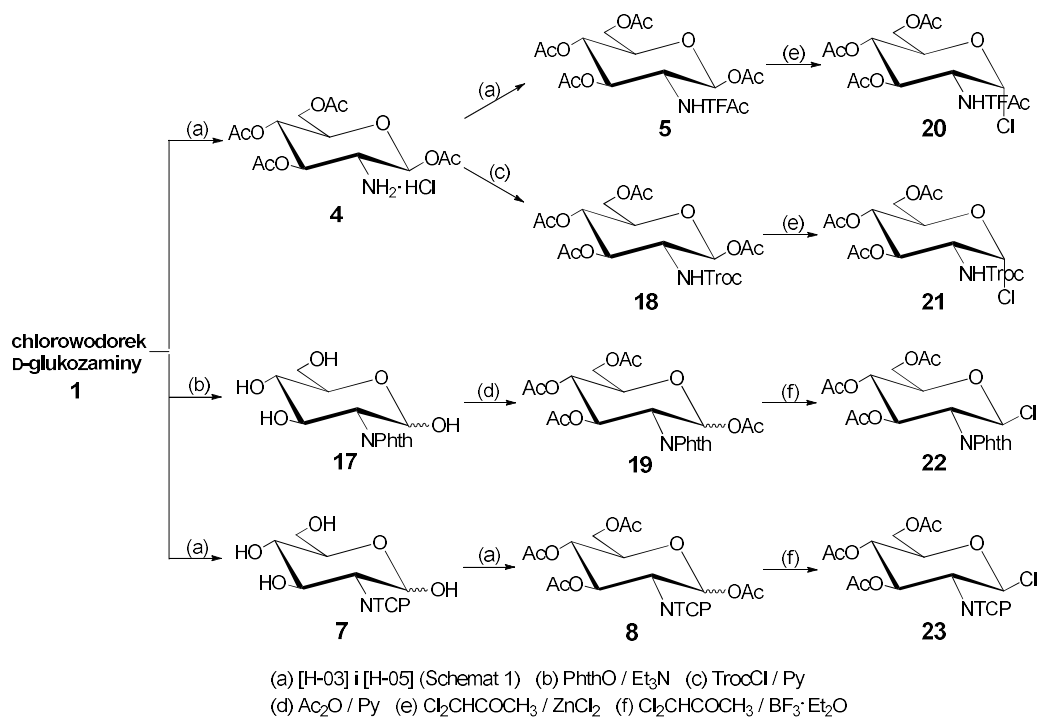
Optymalizacji procedury syntezy D-glukozaminozydów diosgenyłu poświęciłem kolejną pracę [H-07]. Dotyczy ona m.in. zastosowania różnych *N*-chronionych chlorków 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozyłu w syntezie 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu (**12**). Próby znalezienia lepszego donora glikozyłu z tej grupy ograniczyłem do przetestowania czterech chlorków z następującymi grupami przy atomie węgla C-2: trifluoroacetamidową (NHTFac), trichloroetoksykarbonyloaminową (NHTroc), ftalimidową (NPhth) i tetrachloroftalimidową (NTCP) (Rys. 6).



Rys. 6. Testowane chlorki 3,4,6-tri-*O*-acetylo- $\alpha/\beta$ -D-glukozaminopiranozyłowe.

Aby je otrzymać konieczna była uprzednia synteza odpowiednich per-*O*-acetylowych pochodnych *N*-chronionej D-glukozaminy, tj. związków **5**, **8**, **18** i **19** (Schemat 3). Syntezę dwóch pierwszych opisałem we wcześniejszych pracach [H-01] i [H-03] (odpowiednio **1**→**5**

i 1→8 na schemacie 1). Chlorowodorek **4** również acylowałem chlorkiem 2,2,2-trichloroetoksykarbonylu uzyskując związek **18**. Z kolei osłona ftaloilowa została wprowadzona na grupę aminową w chlorowodorku D-glukozaminy (**1**) w podobny sposób jak tetrachloroftaloilowa, tj. w reakcji z bezwodnikiem ftalowym – związek **17**, z którego po acetylowaniu bezwodnikiem octowym w pirydynie uzyskałem pochodną **19**.



Schemat 3.

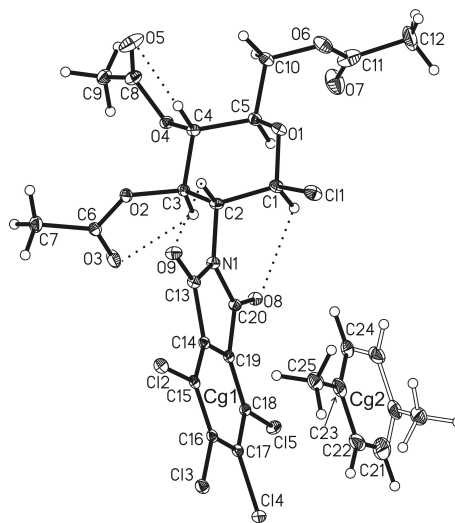
Porównując procedury syntezy *N*-chronionych octanów **5** i **18** z **8** i **19** stwierdzam, że jeśli chlorowodorek D-glukozaminy najpierw *O*-acylowałem Ac<sub>2</sub>O a potem wprowadzałem osłonę na grupę NH<sub>2</sub>, to uzyskiwałem pochodne o konfiguracji β (związki **5** i **18**), a jeśli najpierw została wprowadzona osłona na grupę aminową (pochodne **7** i **17**), a potem przeprowadziłem *O*-acetylowanie to otrzymywałem produkty **8** i **19**, będące mieszaniną anomerów α i β z wyraźną przewagą tego ostatniego.

Do podstawienia w **5**, **8**, **18** i **19** anomerycznej grupy OAc atomem chloru wykorzystałem eter 1,1-dichlorometylometylowy w obecności ZnCl<sub>2</sub> lub BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O. Uzyskałem w ten sposób chlorki **20**–**23**, przy czym dwa pierwsze z nich (**20** i **21**) to produkty o konfiguracji α (*J*<sub>1,2</sub> = 3,6 Hz), a kolejne dwa (**22** i **23**) o konfiguracji β (*J*<sub>1,2</sub> = 9,6 i 9,2 Hz). Syntezę tego ostatniego opisałem już we wcześniejszej pracy [H-03].

Dodatkowo, dla chlorku **23** została wykonana analiza krystalograficzna (Rys. 7). W kryształach, asymetryczna część chlorku składa się z jednej cząsteczki cukru i połowy nieuporządkowanej cząsteczki rozpuszczalnika – toluenu, ułożonej w krystalograficznym planarnym od-

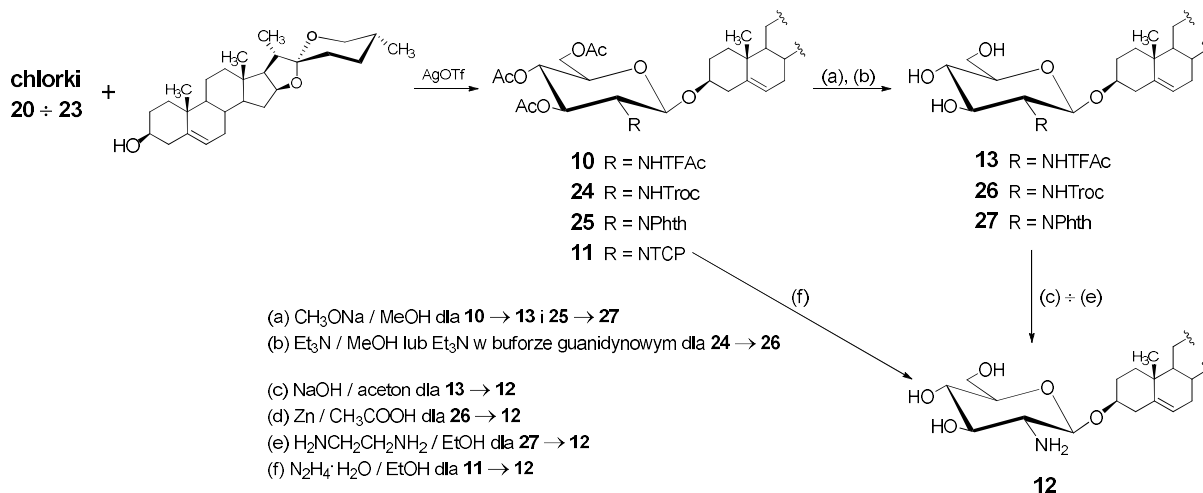
biciu lustrzanym. Rozmieszczenie cząsteczek chlorku **23** i toluenu w sieci krystalicznej jest determinowane oddziaływaniami  $\pi$ - $\pi$  obu pierścieni aromatycznych.

W kryształach chlorek **23** występuje w konformacji krzesłowej  ${}^4C_1$  z wewnątrzcząsteczkowymi oddziaływaniami C–H $\cdots$ O. Analizując geometrię tego związku warto podkreślić, że długość wiązania Cl–C<sub>(1)</sub> wynosząca 1,777 Å jest charakterystyczna dla  $\beta$ -chlorków w konformacji  ${}^4C_1$ , w których nie obserwuje się efektu *endo*-anomerycznego. Chlorki o konfiguracji  $\alpha$ , w których działa efekt *endo*-anomeryczny, charakteryzują się długością wiązania Cl–C<sub>(1)</sub> > 1,8 Å. Grupa tetrachloroftalimidowa jest prawie płaska a atom węgla C-2 cukru leży w płaszczyźnie utworzonej przez dwa połączone pierścienie NTCP. Obserwowana płaskość implikuje hybrydyzację  $sp^2$  atomu azotu. Ułożenie grupy NTCP jest prawie prostopadłe względem płaszczyzny pierścienia piranozowego.



Rys. 7.

Zsyntezowane chlorki **20**÷**23** wykorzystałem w reakcjach sprzęgania z diosgeniną, które były prowadzone w  $CH_2Cl_2$  (**11** i **25**) lub mieszaninie  $CH_2Cl_2/Et_2O$  (**10** i **24**), w obecności AgOTf jako promotora reakcji. Każdorazowo uzyskiwałem w pełni osłonięte  $\beta$ -D-glukozydy diosgenyłu z wydajnością reakcji wahającą się w granicach 69÷99% (Schemat 4).



Schemat 4.

Uzyskane wyniki wskazują, iż zastosowanie donorów glikozyłu z grupami NPhth i NTCP oraz prowadzenie reakcji sprzęgania w dichlorometanie jest korzystniejsze.

W ostatnim etapie koniecznym było usunięcie wszystkich osłon w otrzymanych glikozydach. Zasadniczo *O*-deacetylowanie winno być przeprowadzone jako pierwsze, ponieważ



w innym przypadku należałoby oczekiwać migracji O→N grupy acetylowej. Stosując roztwór MeONa w metanolu usunąłem grupy acetylowe w **10** i **25** otrzymując saponiny **13** i **27**.

Natomiast w przypadku związku **24**, by uniknąć konwersji grupy *N*-Troc w karbaminian, zastosowałem nieco łagodniejsze warunki, tj. roztwór Et<sub>3</sub>N w MeOH oraz mieszaninę MeONa i buforu guanidynowego (guanidyna/azotan(V) guanidyny) w MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. W obydwu przypadkach produktem reakcji była saponina **26**, odpowiednio z 69% i 57% wydajnością.

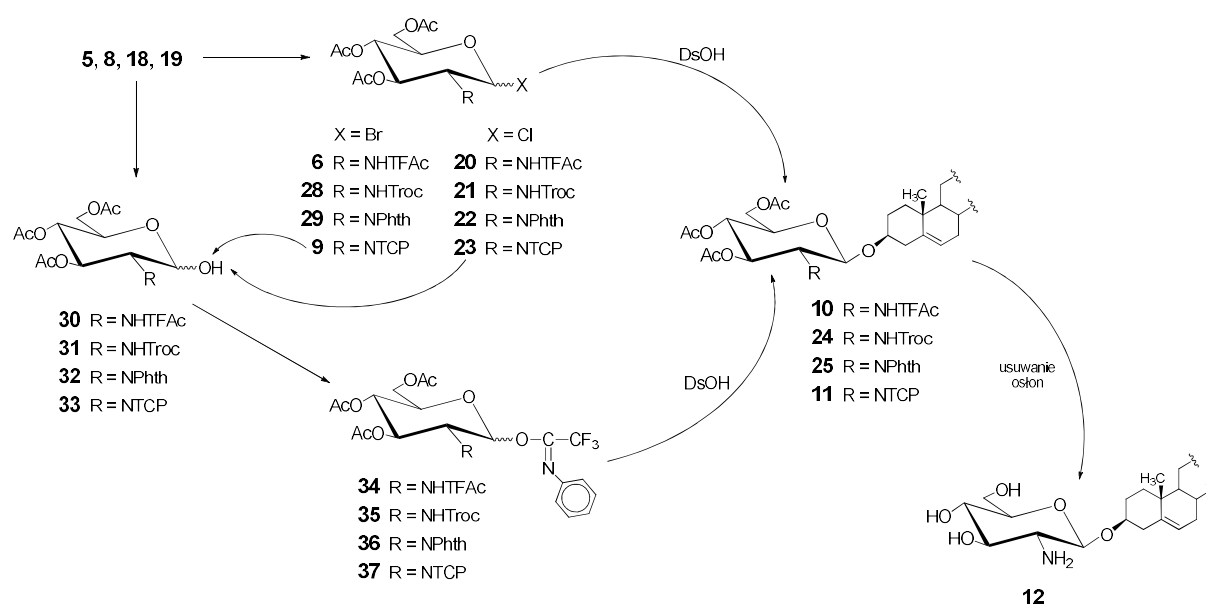
Z kolei osłony grupy aminowej usuwałem za pomocą NaOH w acetonie (NHTFAC, 80%), pyłem cynkowym w CH<sub>3</sub>COOH (NHTroc) i etylenodiaminą w EtOH (NPhth, 81%), uzyskując każdorazowo 2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd diosgenyłu (**12**). W przypadku zastosowania roztworu etylenodiaminy w EtOH do usuwania osłony w saponinie **11** następowało jednoczesne usunięcie wszystkich grup ochronnych (saponina **12**) wraz z utworzeniem produktu migracji O→N grupy acetylowej – związek **16**. Zamiana etanolu na mieszaninę rozpuszczalników CH<sub>3</sub>CN/THF/EtOH zakończyła się niepowodzeniem. Natomiast zastosowanie hydratu hydrazyny w EtOH doprowadziło do otrzymania wyłącznie saponiny **12** z 97% wydajnością.

Kontynuując prace dotyczące optymalizacji procedur otrzymywania 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu (**12**) postanowiłem, oprócz chlorków i bromków D-glukozaminopiranozyłu, wykorzystać jako donory glikozyłu pochodne iminoeterowe, znane w literaturze przedmiotu jako *donory Schmidta*.<sup>[34,35]</sup> Ta metoda syntezy polega na wprowadzeniu grupy –O–C(=NH)CCl<sub>3</sub> lub –O–C(=NPh)CF<sub>3</sub> w położenie C-1 i podstawieniu tej łatwo odchodzącej grupy resztą akceptora glikozyłu.

Do syntezy (*N*-fenylo)trifluoroacetoimidanowych donorów **34**÷**37** wykorzystałem per-*O*-acetylowe pochodne **5**, **8**, **18** i **19** oraz uprzednio uzyskany z nich bromek **9** i chlorek **23** (Schemat 5), co opisałem w pracy [H-08].

1-*O*-Deacetylowanie octanów **5**, **8**, **18** i **19** przeprowadziłem roztworem etylenodiaminy w THF uzyskując związki **30**÷**33** z wydajnością 84% i większą. Jedynie w przypadku **33** wydajność wynosiła zaledwie 36% i wobec tego do uzyskania **33** postanowiłem wykorzystać bromek **9** i chlorek **23**. Hydrolizę tych dwóch halogenków przeprowadziłem w acetonie wodną zawiesiną Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> z wydajnością, odpowiednio 73% i 72%. O ile halogenki **6**, **9** i **20**÷**23** zostały otrzymane wg wcześniej opisanych procedur, to do wprowadzania atomu bromu w **18** i **19** zastosowałem HBr/CH<sub>3</sub>COOH uzyskując w ten sposób bromki **28** i **29**. Wprowadzenia reszty (*N*-fenylo)trifluoroacetimidoidalowej w **30**÷**33** dokonałem za pomocą chlorku (*N*-fenylo)-2,2,2-trifluoroacetimidoilu w obecności K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (*N*-Fenylo)trifluoroacetimidany z ugrupowaniami typu imidowego (NPhth i NTCP) przy C-2 posiadają konfigurację β anomerycznego

atomu węgla – związki **36** i **37**, a pozostałe (**34** i **35**) to mieszaniny anomerów  $\alpha$  i  $\beta$ .



Schemat 5.

Dysponując 12 donorami glikozyli (**6**, **9**, **20-23**, **28**, **29** i **34-37**) oraz mając na uwadze różne sposoby tworzenia wiązania glikozydowego podjąłem próby syntezy saponin uwzględniające kolejność dodawania reagentów, co znane jest w chemii cukrów jako „*procedura normalna*” i „*procedura odwrotna*”. [H-08] W pierwszej z nich promotor jest dodawany do roztworu zawierającego donor i akceptor glikozyli, natomiast w „*procedurze odwrotnej*” donor glikozyli jest dodawany do mieszaniny promotora i akceptora glikozyli. Dodatkowo, wybrane reakcje sprzęgania wyżej wymienionych donorów z diosgeniną prowadziłem w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i/lub w mieszaninie  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$  (Tabela 2).

Reakcje glikozyłowania (Schemat 5) diosgeniny przebiegają wg mechanizmu  $\text{S}_{\text{N}}1$  i/lub  $\text{S}_{\text{N}}2$ , każdorazowo z udziałem tzw. *grupy uczestniczącej*, którą stanowi grupa znajdująca się przy atomie węgla C-2 (NHTFAC, NHTroc, NPhth, NTCP). Największe wydajności (~ 98%) reakcji uzyskałem podczas glikozyłowania DsOH donorami halogenkowymi z grupą NHTroc (Br) oraz NPhth (Cl) przy atomie węgla C-2 (poz. 4 i 12; Tabela 2). Z kolei, gdy przy atomie węgla C-2 znajdowała się grupa NTCP (donor **9**) wydajność syntezy wynosiła 93%. W każdym z tych przypadków promotorem reakcji był AgOTf, a glikozyłowanie prowadziłem wg tzw. „*procedury odwrotnej*”, tzn. donor glikozyli dodawałem jako ostatni składnik mieszaniny reakcyjnej. Stosując donory halogenkowe **6**, **29** i **9** (poz. 1, 5 i 8; Tabela 2) w „*procedurze normalnej*” wydajności reakcji były znacznie niższe, odpowiednio 30%, 51% i 73%. Z kolei glikozyłowanie DsOH bromkami **6**, **28** i **9** jest wydajniejsze niż tak samo *N*-chronionymi chlorkami **20**, **21** i **23** (porównanie w tabeli 2 poz. 2, 4 i 9 z 10, 11 i 13).

Tabela 2. Procedury i rezultaty glikozyłowania diosgeniny.

Lp.	Procedura	Donor glikozyłu	Rozpuszczalnik	Promotor	Grupa przy C-2	Produkt	Wyd. (%)
1	normalna	<b>6</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NHTFAc	<b>10</b>	30
2	odwrotna	<b>6</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NHTFAc	<b>10</b>	77
3	odwrotna	<b>6</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AgOTf	NHTFAc	–	–
4	odwrotna	<b>28</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NHTroc	<b>24</b>	98
5	normalna	<b>29</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NPhth	<b>25</b>	51
6	odwrotna	<b>29</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NPhth	<b>25</b>	55
7	odwrotna	<b>29</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AgOTf	NPhth	<b>25</b>	90
8	normalna	<b>9</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NTCP	<b>11</b>	73
9	odwrotna	<b>9</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AgOTf	NTCP	<b>11</b>	93
10	odwrotna	<b>20</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NHTFAc	<b>10</b>	69
11	odwrotna	<b>21</b> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Et <sub>2</sub> O	AgOTf	NHTroc	<b>24</b>	86
12	odwrotna	<b>22</b> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AgOTf	NPhth	<b>25</b>	99
13	odwrotna	<b>23</b> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AgOTf	NTCP	<b>11</b>	87
14	normalna	<b>34</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	TMSOTf	NHTFAc	<b>10</b>	85
15	normalna	<b>35</b> ( $\alpha+\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	TMSOTf	NHTroc	<b>24</b>	81
16	normalna	<b>36</b> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	TMSOTf	NPhth	<b>25</b>	83
17	normalna	<b>37</b> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	TMSOTf	NTCP	<b>11</b>	52

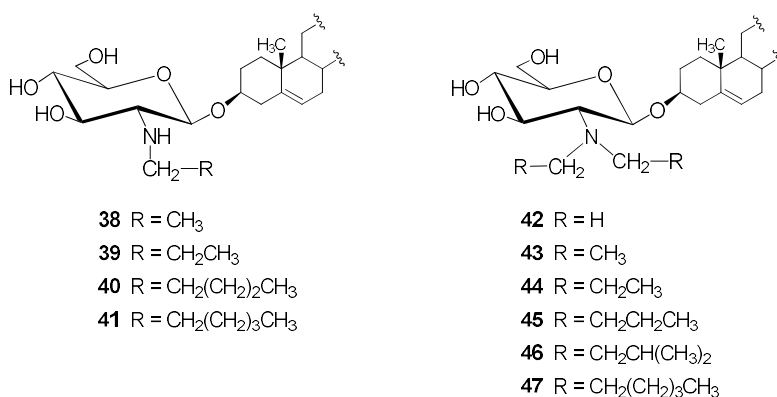
Ponadto, mając na uwadze wydajność reakcji glikozyłowania, zastosowanie CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> jako rozpuszczalnika jest prawie zawsze korzystniejsze, w porównaniu z użyciem mieszaniny CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O, z wyjątkiem przypadku gdy donorem glikozyłu był bromek **28** i chlorek **21** (obydwa z osłoną Troc na funkcji aminowej, poz. 4 i 11 w tabeli 2), w przypadku których wydajności były również wysokie, odpowiednio 99% i 87%. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika jest najbardziej widoczny w reakcji glikozyłowania DsOH donorem **6** wg „procedury odwrotnej”. Mianowicie, stosując mieszaninę CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O uzyskałem glikozyd **10** z 77% wydajnością, podczas gdy w samym CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nie udało się go otrzymać. Po usunięciu wszystkich osłon (wg procedur (a)–(f), Schemat 4) każdorazowo otrzymywałem saponinę **12**.

Ponieważ osłony acetylowe i osłonę TCP można zdejmować jednocześnie w tych samych, słabo zasadowych warunkach, np. wodzianem hydrazyny w EtOH, a zdejmowanie osłon acetylowych i Troc oraz acetylowych i Phth wymaga dwuetapowej procedury, oraz drastyczniejszych warunków, uważam że syntezę D-glukozaminozydu diosgenyłu (**12**) najkorzystniej jest prowadzić wg „procedury odwrotnej”, z wykorzystaniem bromku 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-tetrachloroftalimido- $\alpha,\beta$ -D-glukopiranozyłu (**9**) jako donora glikozyłu, w dichlorometanie jako rozpuszczalniku i stosując AgOTf jako promotor reakcji.

## V. *N*-Alkilowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenylu – [H-08] i [H-09]

Opracowanie wydajnej procedury uzyskiwania glikozydu **12** otworzyło drogę do syntezy szeregu pochodnych, w tym *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych, którym również poświęcona jest praca [H-08]. By to osiągnąć zastosowałem metodę zwaną redukcijnym alkilowaniem amin. Pochodną *N*-monoalkilową uzyskuje się w wyniku traktowania aminy pierwszorzędowej odpowiednim aldehydem (R-CHO) i następnie redukcji uzyskanej iminy. Powszechnie stosowanym reduktorem w tej reakcji jest NaBH<sub>3</sub>CN. *N*-Alkilowa pochodna, jako odpowiednik aminy drugorzędowej, może reagować w tych samych warunkach z kolejną cząsteczką aldehydu tworząc enaminę, z której po redukcji uzyskuje się *N,N*-dialkilową pochodną.

Redukcyjne alkilowanie saponiny **12** 1,2 molowym nadmiarem odpowiedniego aldehydu a potem redukcja dwukrotną molową ilością NaBH<sub>3</sub>CN pozwoliło otrzymać cztery mono- (**38÷41**) i sześć dialkilowych pochodnych (**42÷47**), jako pojedyncze produkty bądź mieszaniny (Rys. 8). Mieszaniny *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych pochodnych zostały każdorazowo rozdzielone metodami chromatograficznymi.



Rys. 8. *N*-Alkilowe i *N,N*-dialkilowe pochodne saponiny **12**.

Budowę saponin **38÷47** ustaliłem na podstawie widm NMR (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) i spektrometrii mas. Podobnie jak podstawowa saponina **12** wszystkie alkilowe pochodne występują w konformacji <sup>4</sup>C<sub>1</sub>, co potwierdzają odpowiednie stałe sprzężenia J<sub>1,2</sub> = 8 Hz i J<sub>2,3</sub> ≈ J<sub>3,4</sub> ≈ J<sub>4,5</sub> ≈ 9÷10 Hz.

Otrzymane saponiny badaliśmy pod kątem zwalczania drobnoustrojów jakimi są grzyby i bakterie. Aktywność przeciwgrzybową badaliśmy na szczepach referencyjnych (z kolekcji ATCC lub PCM) dwóch gatunków zaliczanych do drożdżaków: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* i w stosunku do kropidłaka czarnego (*Aspergillus niger*). Z kolei do badań przeciwbakteryjnych użyliśmy po pięć szczepów referencyjnych bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz gram-dodatnich: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* i *S. epidermidis*.

Za takim wyborem grzybów przemawia m.in. stale wzrastająca liczba zakażeń powodowanych przez grzyby rodzaju *Candida*. Atakują one często błony śluzowe przewodu pokarmowego, jamę ustną i gardło, wywołują stany zapalne skóry. Są one odpowiedzialne za chorobę zwaną kandydozą. Większość infekcji grzybiczych jest powodowana przez gatunek *Candida*.

Bakterie są mikroorganizmami, które mogą zasiedlać większość miejsc na naszej planecie. Zróżnicowane warunki, w których żyją i rozmnażają się spowodowały, że wykształciły one ściany komórkowe zabezpieczające je przed niekorzystnym wpływem otoczenia. Ściana komórkowa jest podstawową osłoną bakterii, zwiększającą odporność i umożliwiającą im prawidłowe funkcjonowanie. Ważną właściwością ściany komórkowej jest jej przepuszczalność, co zostało wykorzystane do podzielenia bakterii na Gram-ujemne i Gram-dodatnie. Dokładna znajomość struktur chemicznych będących składnikami ściany komórkowej tych mikroorganizmów jest niezbędna do poznania sposobów oddziaływania bakterii ze środowiskiem, w tym bardzo ważnych mechanizmów związanych z zapobieganiem i zwalczaniem infekcji bakteryjnych. Zarówno do bakterii G<sup>-</sup> jak i G<sup>+</sup> należy wiele gatunków patogennych. Do pierwszej z nich zaliczana jest m.in. pałeczka okrężnicy i pałeczka zapalenia płuc, a do G<sup>+</sup> należą wysoce patogenne enterokoki i gronkowce. Wiele z nich jest odpowiedzialnych za kliniczne infekcje bakteryjne, o czym pisałem już w pracy [H-04] wchodzącej w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego. Ponieważ budowa ściany komórkowej bakterii G<sup>+</sup> wyraźnie różni się od ściany komórkowej bakterii G<sup>-</sup>, pomimo posiadania kilku prawie identycznych elementów, celem było sprawdzenie aktywności wobec obydwu grup.

Wobec grzybów gatunku *Candida* najlepszą aktywność wykazała saponina **14** (MIC = 0,5 i 2 µg/ml, odpowiednio dla *C. tropicalis* i *C. albicans*) czyli podstawowy glikozyd (chloroderek) mający sprotonowaną grupę NH<sub>2</sub> (Tabela 3) [H-08].

Tabela 3. Minimalne stężenie hamujące (MIC) [µg/ml] dla saponin **14**, **38÷40** i **42÷47** względem wybranych grzybów.

Związek Grzyb	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>14</b> (HCl)	2	0,5	64
<b>38</b>	16	-	8
<b>39</b>	8	-	8
<b>40</b>	128	64	128
<b>42</b>	2	2	64
<b>43</b>	2	1	128
<b>44</b>	4	4	64
<b>45</b>	8	128	16
<b>46</b>	16	32	256
<b>47</b>	64	128	128

W następnej kolejności są trzy *N,N*-dialkilowe saponiny **42÷44** o krótkich łańcuchach węglowych (1÷3 atomów węgla) z MIC = 1÷4 µg/ml. Znacznie słabsze rezultaty (MIC ≥ 8 µg/ml) otrzymaliśmy dla dialkilowych pochodnych o dłuższych łańcuchach węglowych **45÷47** (4÷6 atomów węgla). Saponiny *N*-monoalkilowe **38÷40** należy uznać raczej za mało aktywne. Z kolei wobec kropidlaka czarnego (*A. niger*) większość saponin jest nieaktywna, z wyjątkiem *N*-etylowej (**38**), *N*-propylowej (**39**) i *N,N*-dibutylowej (**45**) odznaczających się większą aktywnością niż podstawowy chlorowodorek **14** (MIC = 8; 8; 16 i 64, odpowiednio).

Wszystkie saponiny okazały się nieaktywne w stosunku do bakterii Gram-ujemnych.

Z kolei wobec bakterii Gram-dodatnich większość *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych saponin cechuje się określoną aktywnością, które przedstawiłem w tabeli 4 [H-08].

Tabela 4. Minimalne stężenie hamujące (MIC) [µg/ml] dla saponin **14**, **38÷40** i **42÷47** względem wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich.

Związek Bakteria	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<b>14</b> (HCl)	16	16	16	8	16
<b>38</b>	1	2	0,5	64	8
<b>39</b>	1	8	1	64	32
<b>40</b>	> 1024	1024	1024	> 1024	512
<b>42</b>	32	32	64	8	64
<b>43</b>	32	32	32	32	16
<b>44</b>	8	8	32	16	16
<b>45</b>	8	8	8	16	16
<b>46</b>	4	16	32	32	8
<b>47</b>	64	128	256	64	512

Powodem odmiennej aktywności wobec bakterii G<sup>-</sup> i G<sup>+</sup> są zapewne różnice w ich budowie. W przypadku tych ostatnich nie wyróżnia się zewnętrznej błony komórkowej zbudowanej z białek, fosfolipidów i lipopolisacharydu.

Analizując uzyskane wartości MIC mogą stwierdzić, że prawie wszystkie testowane mono- i dialkilowe saponiny hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich. Saponina **38** z grupą *N*-etyloaminową przy C-2 jest najaktywniejszą wobec paciorkowca kałowego (*E. faecalis*), dwóch gatunków bakterii należących do rodzaju gronkowców (*S. aureus* i *S. epidermidis*) oraz bakterii *R. equi* (MIC = 0,5÷8 µg/ml). Saponina **39** z grupą *N*-propylową wykazuje podobną aktywność wobec paciorkowca i obydwu gatunków gronkowca (MIC = 1÷8 µg/ml).

Aktywność saponin **38÷47** zsyntezowanych przez modyfikację funkcji aminowej w **12** porównują z aktywnością chlorowodoru **14**. Ten ostatni, badany kilka lat wcześniej, okazał się być bardzo aktywny samodzielnie jak i w połączeniu z wankomycyną oraz daptomycyną wobec szpitalnych szczepów, m.in. metycylino- oraz wankomycyno-opornych i wrażliwych bakterii *S. aureus* i *E. faecalis* (Tabela 1) [H-04]. I tak, aktywniejsze wobec *E. faecalis* oraz *S. aureus* i *S. epidermidis* od chlorowodoru **14** są saponiny z krótkimi łańcuchami *N*-alkilowymi – związki **38** i **39**. Z kolei trzy *N,N*-dialkilowe pochodne **44÷46** wykazują także silniejszą lub bardzo zbliżoną aktywność do chlorowodoru **14**. Pewnym ewenementem, dość trudnym do wyjaśnienia, jest słabsza aktywność *N,N*-dialkilowych saponin o najkrótszych łańcuchach węglowych, tj. związków **42** i **43**. Dwie saponiny o najdłuższych łańcuchach węglowych, pochodna *N*-pentyłowa (**40**) i *N,N*-diheksylowa (**47**) są nieaktywne wobec testowanych szczepów bakterii G+.

Przedstawione wyniki wskazują, iż wydłużenie łańcucha alkilowego jak również dodatek kolejnej grupy są raczej niekorzystne z punktu widzenia aktywności przeciwbakteryjnej. Prawdopodobnie związane jest to z mniejszą rozpuszczalnością saponin o dłuższych łańcuchach alkilowych bądź zdolnością do tworzenia struktur micelarnych.

W kolejnej swojej pracy [H-09] składającej się na osiągnięcie habilitacyjne postanowiłem sprawdzić jak chlorowodorek **14** oraz wybrane *N,N*-dialkilowe pochodne o krótkich łańcuchach alkilowych (**42÷45**) zachowują się wobec szpitalnych szczepów grzybów gatunku *non-albicans Candida*.

Grzyby, w przeciwieństwie do bakterii, zaliczane są do organizmów eukariotycznych posiadających jądro komórkowe z chromosomami. Struktura ściany komórkowej grzybów jest charakterystyczna dla tej grupy, ma budowę warstwową a jej elementy szkieletowe są zbudowane z chityny, chitozanu oraz kompleksów chityna-glukany. Podanie antybiotyku powoduje jego interakcję ze sterolami efektem czego jest zaburzenie integralności błony komórkowej.

Na początku XX w. gatunek *Candida albicans* uznawano za jedyny patogenny u ludzi spośród grzybów tego rodzaju. Jednak obecnie na podstawie wieloletnich badań za patogenne uznaje się aż 14 gatunków, w tym m.in. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. Te gatunki są często charakteryzowane jako grzyby o zmniejszonej podatności na działanie środków przeciwgrzybowych.

Wobec tak dużej liczby *non-albicans Candida* i ich lekooporności podjęliśmy próbę przebadania na szczepach szpitalnych następujących 5 saponin: chlorowodorek **14**, pochodne *N,N*-dimetylową (**42**), *N,N*-dietylową (**43**), *N,N*-dipropylową (**44**) oraz *N,N*-dibutyłową (**45**) (Rys. 3 i 8). Te związki charakteryzowały się najlepszymi wartościami MIC wobec szczepów

referencyjnych grzybów gatunku *Candida* (Tabela 3). Szczepy kliniczne *C. glabrata* (22 izolaty), *C. krusei* (12), *C. parapsilosis* (19) i *C. tropicalis* (13) otrzymaliśmy z Zakładu Mykologii Collegium Medicum UJ. Zostały zebrane od pacjentów cierpiących na grzybicę pochwy, skóry i ust. Jako związki wzorcowe stosowaliśmy ogólnodostępne środki przeciwgrzybicze, w tym antybiotyki, m.in. amfoterycynę B, klotrimazol, flukonazol, itraconazol, natamycynę i nystatynę [H-09]. Rezultaty badań zawiera tabela 5.

Tabela 5. Wartości MIC<sub>50</sub> i MIC<sub>90</sub> dla chlorowodoru **14** i referencyjnych farmaceutyków względem szczepów szpitalnych grzybów rodzaju *Candida* [H-09].

Saponina Antybiotyk	Grzyb	<i>C. glabrata</i> (n = 22)*		<i>C. krusei</i> (n = 12)		<i>C. parapsilosis</i> (n = 19)		<i>C. tropicalis</i> (n = 13)	
		50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
<b>14</b>		2	4	16	1024	2	4	4	1024
<b>42</b>		4	4	16	1024	1	2	4	1024
<b>43</b>		4	4	64	1024	2	4	4	512
<b>44</b>		4	8	1024	1024	4	4	8	1024
<b>45</b>		8	16	1024	1024	8	16	128	1024
Amfoterycyna B		2	2	2	2	2	4	1	2
Klotrimazol		4	8	0,25	0,25	0,25	0,25	4	16
Flukonazol		128	128	32	64	4	8	128	1024
Itrakonazol		4	32	0,25	0,25	0,25	0,25	256	1024
Natamycyna		2	2	1	1	4	4	2	4
Nystatyna		8	8	2	4	4	8	2	4

\* n w nawiasie oznacza liczbę badanych izolatów danego patogena

Analizując dane w tej tabeli stwierdzam, że gatunek *C. glabrata* jest bardzo podatny na saponiny **14**, **42** i **43**, które hamują wzrost grzyba w 90% przy stężeniu 4 µg/ml i niższym. Glikozydy **44** i **45** cechuje nieco gorsza aktywność, MIC<sub>90</sub> wynosi odpowiednio 8 i 16 µg/ml. Ten gatunek grzyba odznacza się znaczącą odpornością na flukonazol i itraconazol, a więc leki zaliczane do pochodnych triazolu. Z kolei klotrimazol, będący pochodną imidazolu oraz pozostałe trzy antybiotyki, zaliczane do polienowych, wykazywały porównywalną aktywność z saponinami **14**, **42** i **43**.

Z kolei aż 4 saponiny (**14** i **42-44**) wykazały silną aktywność wobec gatunku *C. parapsilosis*. Najaktywniejszym glikozydem jest tu pochodna **42**, tj. *N,N*-dimetylowa, która hamuje w 90% wzrost większości izolatów przy stężeniu 2 µg/ml. Ten rezultat jest dużo lepszy od wyników dla trzech antybiotyków (MIC<sub>90</sub> = 4-8 µg/ml). Jedynie dwa leki przeciwgrzybicze (klotrimazol i itraconazol) okazały się aktywniejsze od tej saponiny (MIC<sub>90</sub> = 0,25 µg/ml).



Dwa gatunki, tj. *C. krusei* i *C. tropicalis* wykazują pewną rozbieżność w swojej wrażliwości na badane saponiny. O ile wartości MIC<sub>50</sub> dla większości izolatów wynoszą 4÷128 µg/ml to do zahamowania wzrostu poszczególnych szczepów w 90% wymagane jest najwyższe stężenie (1024 µg/ml). Wobec tych dwóch szczepów trzy antybiotyki i większość konwencjonalnych środków przeciwgrzybowych okazują się być skuteczniejsze.

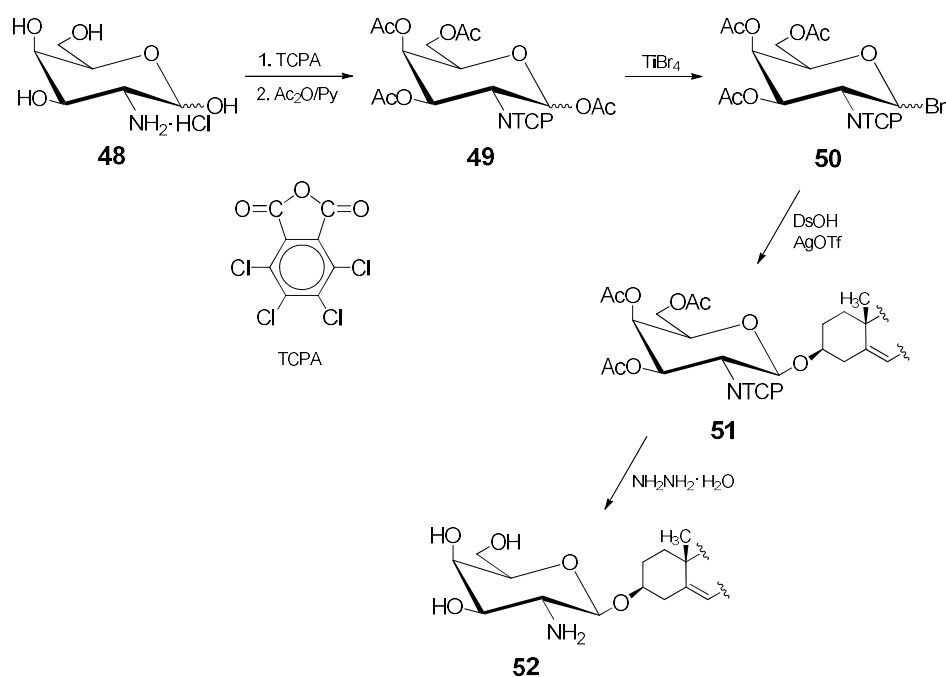
Dodatkowo w pracy [H-09], dla wszystkich saponin badaliśmy ich aktywność hemolityczną. Krwinki czerwone zostały wyizolowane z ludzkiej krwi pochodzącej od zdrowego dawcy. Minimalne stężenie powodujące hemolizę (MHC) zostało ustalone jako najniższe stężenie, które powoduje przynajmniej 10±0,5% hemolizy. Wyniki badań hemolitycznych pokazały, że saponiny 14 i 42÷45 przy ich mikrobiologicznie aktywnych stężeniach (0,5÷256 µg/ml) są nietoksyczne dla ludzkich krwinek czerwonych. Hemoliza nie była obserwowana nawet gdy erytrocyty były wystawione na działanie saponin o stężeniu 256 µg/ml, które jest wiele razy wyższe od wartości MIC = 2÷4 µg/ml dla większości wyizolowanych rodzajów *Candida*.

Aktualny stan możliwości wyboru opcji terapeutycznych oraz otrzymane wyniki zachęcają do kontynuowania badań nad steroidowymi saponinami i ich ewentualnego zastosowania jako przyszłych środków antymikotycznych, szczególnie do infekcji powodowanych przez gatunek *C. glabrata*, charakteryzowany jako szczep bardzo szybko zyskujący lekooporność. Badania aktywności biologicznej testowanych związków wymagają ich kontynuowania, zapewne z użyciem większej liczby klinicznych izolatów i ewentualnie innych gatunków grzybów egzystujących w organizmie człowieka.

## **VI. 2-Amino-2-deoksy-β-D-galaktopiranozyd diosgenyłu i jego pochodne – [H-10]**

W kolejnej swojej pracy [H-10], składającej się na osiągnięcie habilitacyjne, postanowiłem sprawdzić jak zamiana D-glukozaminy na D-galaktozaminę wpłynie na aktywność przeciwdrobnoustrojową tego rodzaju saponin. Cukry te różnią się wyłącznie konfiguracją atomu węgla C-4 i interesującym jest jak ta konfiguracja wpływa na właściwości tego rodzaju saponin.

Galaktozydy diosgenyłu są znacznie rzadziej izolowane z roślin niż glukozydy. Saponiny, w których diosgenina jest połączona bezpośrednio z D-galaktozą należą do smilacinozydów, funkiozydów czy indiozydów.<sup>[36,37]</sup> Podobnie jak w przypadku glikozydów diosgenyłu zawierających resztę D-glukozaminy, w naturze nie są spotykane saponiny spirostanowe zawierające resztę D-galaktozaminy. Korzystając z naszych doświadczeń w syntezie D-glukozaminozydów postanowiłem uzyskać serię 2-amino-2-deoksy-D-galaktopiranozydów diosgenyłu. By zsyntezować glikozyd D-galakto przeprowadziłem sekwencję reakcji zaprezentowaną na schemacie 6.



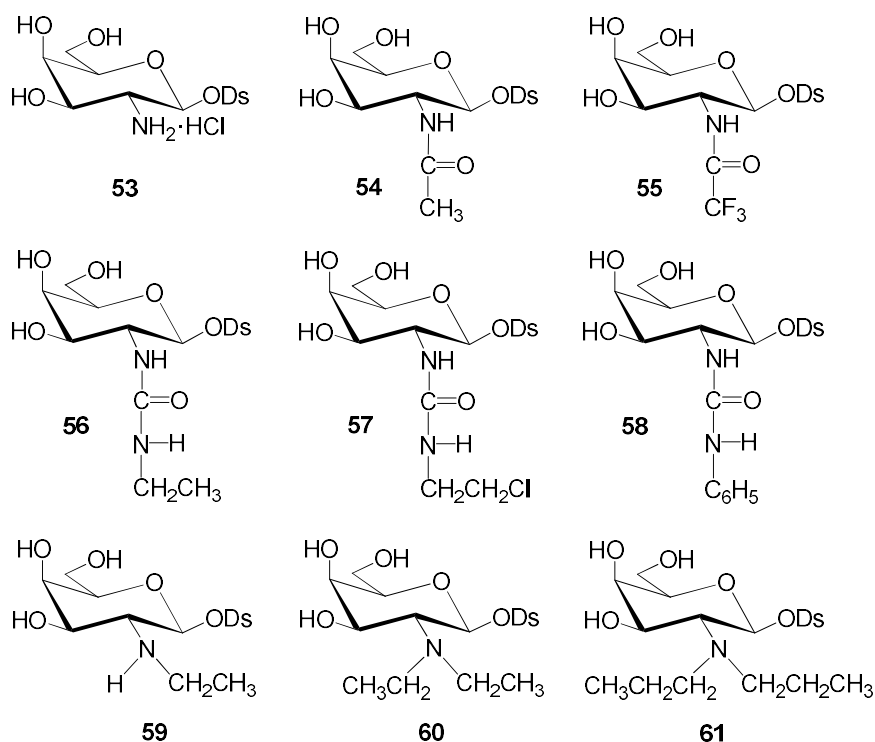
Schemat 6.

Podobnie jak w przypadku serii D-gluko, do uzyskania donora glikozyłu, tj. bromku 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-tetrachloroformylideno- $\alpha/\beta$ -D-galaktopiranozyłu (**50**) użyłem chlorowodoru D-galaktozaminy (**48**), najpierw acylując go bezwodnikiem tetrachloroformylidenu (TCPA) a potem bezwodnikiem octowym w pirydynie. Uzyskałem w ten sposób mieszaninę octanów **49**. Stosunek anomerów  $\alpha : \beta$  wynosił 3 : 7, co ustaliłem na podstawie widm  $^1\text{H}$  NMR. Stosując również  $\text{TiBr}_4$  jako odczynnik bromujący otrzymałem mieszaninę anomeryczną bromków **50** z wyraźną przewagą anomeru  $\beta$  ( $\alpha : \beta = 1 : 4$ ). Ta mieszanina, z powodu wysokiej reaktywności bromków, okazała się chromatograficznie nie do rozdzielenia. Udział poszczególnych anomerów został oszacowany na podstawie widm  $^1\text{H}$  NMR (H-1 dla anomeru  $\alpha$  dublet,  $\delta = 6,65$  ppm,  $J_{1,2} = 3,7$  Hz a dla anomeru  $\beta$  dublet przy  $\delta = 6,35$  ppm,  $J_{1,2} = 9,6$  Hz). Ten donor został od razu użyty w reakcji kondensacji z diosgeniną. Reakcję prowadziłem w dichlorometanie wg tzw. „*procedury odwrotnej*”, uzyskując glikozyd **51** z 80% wydajnością.

Budowę D-galaktozaminozydu **51** i tym samym konformację  $^4\text{C}_1$  pierścienia piranozowego ustaliłem na podstawie widm NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY i HSQC). Stała sprzężenia pomiędzy aksjalnie zorientowanymi protonami H-1 i H-2 wynosząca  $J_{1,2} = 8,4$  Hz wskazuje na ekwatorialną orientację aglikonu. Z kolei stałe  $J_{2,3} = 11,3$  Hz i  $J_{3,4} = 3,1$  Hz potwierdzają aksjalne i ekwatorialne ułożenie protonów, odpowiednio H-3 i H-4.

Do deprotekcji wszystkich grup w saponinie **51** zastosowałem opracowaną wcześniej procedurę dla saponin serii D-gluko [**H-01**] i [**H-03**], tj. roztwór hydratu hydrazyny w etanolu, uzyskując 3-*O*-(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-galaktopiranozylo)diosgeninę (**52**).

W kolejnych etapach dokonałem funkcjonalizacji grupy aminowej w **52**. Otrzymałem jej chlorowodurek **53**, dwie pochodne acetylowe **54** i **55**, trzy z ugrupowaniem mocznikowym **56÷58**, jedną *N*-alkilową **59** oraz dwie *N,N*-dialkilowe **60** i **61** (Rys. 9).



Rys. 9. D-Galaktozaminozydy diosgenyłu.

Zastosowane procedury syntezy D-galaktozaminozydów diosgenyłu **53÷61** były zbliżone do opisanych wcześniej dla saponin z resztą D-glukozaminy, tj. reakcja z HCl/MeOH, acetylowanie odpowiednim bezwodnikiem w metanolu lub pirydynie, reakcja z komercyjnie dostępnymi izocyjanianami etylu, 2-chloroetylu i fenylu oraz redukcyjne aminowanie (reakcja z acetaldehydem lub propanalem i następująca po niej redukcja NaBH<sub>3</sub>CN).

Fakt wprowadzenia do saponiny **52** nowej grupy funkcyjnej potwierdzałem metodami spektroskopowymi (IR, NMR). Na przykład, w widmach IR związków **54** i **55** obecne są pasma amidowe I i II w zakresie 1715-1650 cm<sup>-1</sup> a w pochodnych ureidowych **56÷58** w przedziale 1665-1550 cm<sup>-1</sup>. Z kolei o obecności grupy C=O w **54÷58** świadczą sygnały atomów węgla karbonylowego w widmach <sup>13</sup>C NMR przy 160-171 ppm, z wyjątkiem saponiny **55**, w której z powodu obecności trzech atomów fluoru ten sygnał położony jest przy δ = 157,26 ppm. Dodatkowo, w widmie <sup>13</sup>C NMR glikozydu **55** przy δ ≈ 157 ppm, widoczny jest kwartet od karbonylowego atomu węgla ze stałymi sprzężeniami J<sub>C,F</sub> ≈ 39 Hz i kwartet od węgla grupy CF<sub>3</sub> przy δ ≈ 117 ppm ze stałymi sprzężeniami J<sub>C,F</sub> ≈ 290 Hz. Natomiast w saponinach **59÷61** obecne są sygnały świadczące o obecności protonów i atomów węgla wchodzących w skład właściwego łańcucha alkilowego.

Uzyskane D-galaktozaminozydy badaliśmy pod kątem ich aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej. Badania mikrobiologiczne przeprowadziliśmy na dwóch szczepach referencyjnych (z kolekcji ATCC lub PCM) grzybów *Candida albicans* i *Candida tropicalis* oraz wybranych bakteriami Gram-dodatnich, tj. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* i *S. pneumoniae* (Tabela 6).

Tabela 6. Minimalne stężenie hamujące (MIC) [ $\mu\text{g/ml}$ ] dla saponin **53-61** względem wybranych szczepów grzybów i bakterii Gram-dodatnich.

Związek Grzyb Bakteria	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>53</b> (HCl)	64	4	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<b>54</b>	16	8	16	8	16	8	8	32
<b>55</b>	> 1024	> 1024	32	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<b>56</b>	> 1024	64	512	16	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<b>57</b>	64	16	16	8	16	8	8	8
<b>58</b>	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<b>59</b>	8	4	8	2	4	2	2	2
<b>60</b>	4	2	16	> 1024	16	32	8	32
<b>61</b>	8	8	64	> 1024	64	32	64	32

Analizując wartości MIC podane w tej tabeli mogę stwierdzić, że niektóre z testowanych saponin charakteryzują się selektywną aktywnością wobec drobnoustrojów.

Zmiana konfiguracji atomu węgla C-4 w pierścieniu cukrowym niekorzystnie wpłynęła na aktywność chlorowodoru **53** w porównaniu z jego odpowiednikiem D-gluko. Otóż, chlorowodorek **53** w mniejszym stopniu niż chlorowodorek D-gluko **14** hamuje wzrost obydwu grzybów (dla *C. tropicalis* MIC = 4  $\mu\text{g/ml}$  a dla *C. albicans* zaledwie 64  $\mu\text{g/ml}$ ), przy jednoczesnym braku aktywności wobec bakterii G+, którą to aktywność wykazywała saponina **14** (Tabele 3 i 4).

Z kolei pochodna N-acetylowa (**54**) hamuje wzrost wszystkich szczepów referencyjnych grzybów i bakterii G+ (MIC 8-32  $\mu\text{g/ml}$ ) a N-trifluoroacetylowa (**55**), prawdopodobnie z powodu obecności trzech silnie elektroujemnych atomów fluoru, jest praktycznie nieaktywna.

Wprowadzenie ugrupowania mocznikowego wpłynęło również negatywnie na aktywność przeciwdrobnoustrojową tych saponin. Spośród trzech ureidowych pochodnych (**56-58**) tylko saponina **57**, zawierająca fragment chloroetylomocznikowy, wykazuje niewielką aktywność wobec wszystkich badanych patogenów, z MIC wynoszącym 8-64  $\mu\text{g/ml}$ . Natomiast

2-etyloureidowa (**56**) hamuje tylko w niewielkim stopniu wzrost grzyba *C. tropicalis* (MIC = 64 µg/ml) i bakterii *E. faecium* (MIC = 16 µg/ml), a 2-fenyloureidowa (**58**) jest w ogóle nieaktywna. To sugeruje, że elektroujemny atom chloru poprawia właściwości inhibicyjne ureidowych saponin.

Najlepsze rezultaty wobec obydwu rodzajów *Candida* uzyskałem dla pochodnych alkilowych **59-61** z wartościami MIC w zakresie 2-8 µg/ml, a więc zbliżonymi do uzyskanych dla analogicznych alkilowych pochodnych D-glukozaminozydu diosgenylu (**38**, **43** i **44**, Tabela 5). Z kolei wobec bakterii G<sup>+</sup> saponina z jedną grupą *N*-etylową przy atomie węgla C-2 (**59**) okazuje się być najaktywniejszą w grupie badanych D-galaktozaminozydów. Wprowadzenie dodatkowej grupy etylowej pogorszyło aktywność przeciwbakteryjną pochodnej **60**, w szczególności w odniesieniu do *E. faecium* i *S. aureus* ATCC 29923. Wprowadzenie dwóch grup propylowych jeszcze bardziej obniżyło aktywność pochodnej **61** w stosunku do **59** i **60**. Rezultaty tych badań są zgodne z wynikami otrzymanymi dla *N*-alkilowych i *N,N*-alkilowych pochodnych D-glukozaminozydów (Tabela 5). Albowiem monoetylowe pochodne, zarówno serii D-gluko jak i D-galakto, są najbardziej aktywnymi saponinami w odniesieniu do bakterii G<sup>+</sup> spośród wszystkich testowanych *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych pochodnych.

Analiza zależności między budową a biologiczną aktywnością prezentowanych pochodnych 2-amino-2-deoksy-β-D-galaktopiranozydu diosgenylu pokazuje, że *N*-alkilowanie funkcji aminowej wydaje się być najkorzystniejszym sposobem modyfikacji. Wprowadzenie jednej etylowej (**59**), dwóch etylowych (**60**) lub dwóch propylowych (**61**) grup alkilowych znacznie poprawia właściwości grzybobójcze saponin serii D-galakto w porównaniu z chlorowodorkiem i pozostałymi pochodnymi.

## VII. Podsumowanie

Synteza i badania przeciwdrobnoustrojowe glikozydów diosgenylu są niezwykle atrakcyjnym kierunkiem badań. Ich rezultatem jest uzyskiwanie saponin o różnych strukturach chemicznych. Opisane przeze mnie saponiny można otrzymać ze stosunkowo dobrą wydajnością a wyniki badań ich aktywności biologicznej wyraźnie wskazują, że właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze zależą od budowy tych glukozaminozydów.

Podsumowując badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego stwierdzam, że:

- po raz pierwszy przeprowadziłem syntezę β-glikozydów diosgenylu zawierających reszty D-glukozaminy i D-galaktozaminy;
- udowodniłem, że dwie nowe saponiny indukują apoptozę i nekrozę w komórkach od pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną;

- po raz pierwszy zostały wykonane dla chlorowodoru D-glukozaminozydu diosgenyłu badania *in vitro* i *in vivo* aktywności przeciwbakteryjnej na szczepach szpitalnych, udowadniające, iż ta saponina może stanowić środek przeciwbakteryjny zwalczający bakterie G+, w tym wykazujące oporność wobec metycyliny i wankomycyny;
- zaobserwowałem synergizm podczas stosowania chlorowodoru D-glukozaminozydu diosgenyłu w połączeniu z daptomycyną i wankomycyną;
- uzyskałem ponad 20 nowych saponin w wyniku modyfikacji funkcji aminowej, co pozwoliło na znaczne zwiększenie stanu wiedzy na temat właściwości biologicznych tej grupy związków;
- badane saponiny prawdopodobnie ułatwiają wnikanie antybiotyków i leków przeciwgrzybowych do wnętrza komórek;
- wśród D-glukozaminozydów diosgenyłu z krótkimi łańcuchami dialkilowymi można poszukiwać nowych środków antymikotycznych, szczególnie dla infekcji wywołanych przez grzyby rodzaju *Candida*;
- konfiguracja atomu węgla C-4 w pierścieniu cukrowym (zamiana D-Glc na D-Gal) ma wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową.

## Literatura

- [1] K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, 1995.
- [2] R. Koh, I. Tay, *Saponins Properties, applications and health benefits*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012.
- [3] C-R. Yang, O. Tanaka, *Advances in Plant Glycosides, Chemistry and Biology*, Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [4] M. Thakur, M.F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng, *Bot.: Targets and Therapy*, **1** (2011) 19-29.
- [5] B. Yu, Y. Zhang, P. Tang, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 5145-5161.
- [6] Y. Yang, S. Laval, B. Yu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **71** (2014) 137-226.
- [7] S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden, *J. Ethnopharmacol.*, **94** (2004) 219-243.
- [8] P.R. Ravikumar, P. Hammesfahr, Ch. J. Sih, *J. Pharm. Sci.*, **68** (1979) 900-903.
- [9] S. Man, W. Gao, Y. Zhang, L. Huang, C. Liu, *Fitoterapia*, **81** (2010) 703-714.
- [10] R. Bansal, P.Ch. Acharya, *Chem. Rev.*, **114** (2014) 6986-7005.
- [11] I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska, *Phytochem. Rev.*, **9** (2010) 425-474.
- [12] J-Ch. Wei, W-Y. Gao, X-D. Yan, Y. Wang, S-S. Jing, P-G. Xiao, *Chem. Biodivers.*, **11** (2014) 1277-1297.
- [13] B.T. Sun, L.H. Zheng, Y.L. Bao, Ch.L. Yu, Y. Wu, X.Y. Meng, Y.X. Li, *Eur. J. Pharmacol.*, **654** (2011) 129-134.
- [14] Z. Liu, W. Gao, S. Jing, Y. Zhang, S. Man, Y. Wang, J. Zhang, Ch. Liu, *J. Ethnopharmacol.*, **149** (2013) 422-430.
- [15] Y. Wang, Q-Y. He, J-F. Chiu, *Eur. J. Pharmacol.*, **735** (2014) 52-58.
- [16] M. Li, X. Han, B. Yu, *Carbohydr. Res.*, **338** (2003) 117-121.

- [17] Y. Wang, Y. Zhang, Z. Zhu, S. Zhu, Y. Li, M. Lia, B. Yu, *Bioorg. Med. Chem.*, **15** (2007) 2528-2532.
- [18] W. Li, Z. Qiu, Y. Wang, Y. Zhang, M. Li, J. Yu, L. Zhang, Z. Zhu, B. Yu, *Carbohydr. Res.* **342** (2007) 2705-2715.
- [19] J.C. Hernández, F. León, I. Brouard, F. Torres, S. Rubio, J. Quintana, F. Estévez, J. Bermejo, *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (2008) 2063-2076.
- [20] B. Wang, J. Chun, Y. Liu, Y.-S. Wang, E.-J. Joo, Y.S. Kim, M.S. Cheng, *Org. Biomol. Chem.*, **10** (2012) 8822-8834.
- [21] R. Zhang, B. Huang, D. Dua, X. Guo, G. Xin, Z. Xing, Y. Liang, Y. Chen, Q. Chen, Y. He, W. Huang, *Steroids*, **78** (2013) 1064-1070.
- [22] J. Liu, L. Lua, L. Kang, Y. Liu, Y. Zhao, Ch. Xiong, Y. Zhang, L. Yu, B. Ma, *Carbohydr. Res.*, **402** (2015) 71-76.
- [23] W.S. Sung, D.G. Lee, *Biol. Pharm. Bull.*, **31** (2008) 1614-1617.
- [24] S. Datta, S. Maitra, P. Gayen, S. P. Sinha Babu, *Parasitol. Res.*, **105** (2009) 697-702.
- [25] H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **21** (1982) 155-173.
- [26] R.R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25** (1986) 212-234.
- [27] R.R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **50** (1994) 21-124
- [28] J. Banoub, P. Boullanger, D. Lafont, *Chem. Rev.*, **92** (1992) 1167-1195.
- [29] Y. Yang, B. Yu, *Tetrahedron Lett.*, **48** (2007) 4557-4560.
- [30] M.J. Kaskiw, M.L. Tassotto, J. Th'ng, Z-H. Jiang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (2008) 3209-3217.
- [31] M.J. Kaskiw, M.L. Tassotto, M. Mok, S.L. Tokar, R. Pycko, J. Th'ng, Z-H. Jiang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (2009) 7670-7679.
- [32] M.A. Fernandez-Herrera, H. Lopez-Munoz, J.M.V. Hernandez-Vazquez, L. Sanchez-Sanchez, M.L. Escobar-Sanchez, B.M. Pinto, J. Sandoval-Ramirez, *European J. Med. Chem.*, **54** (2012) 721-727.
- [33] B. Wang, Y. Liu, Y. Wang, X. Liu, M-S. Cheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22** (2012) 7110-7113.
- [34] R.R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19** (1980) 731-732.
- [35] R.R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22** (1983) 776-777.
- [36] S-L. Yang, X-K. Liu, H. Wu, H-B. Wang, Ch. Qing, *Steroids*, **74** (2009) 7-12.
- [37] J. Gao, X. Li, G. Gu, B. Sun, M. Cui, M. Ji, H. Lou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** (2011) 622-627.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania naukowo-badawcze zacząłem realizować na ówczesnym Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w ramach Naukowego Koła Chemików prezentując na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Chemicznego w 1979 r. we Wrocławiu poster dotyczący oznaczenia śladowych ilości metali ciężkich w materiale biologicznym pozyskanym z Zatoki Puckiej:

1. K. Doroszuk, H. Myszka, Z. Pawlak, *Oznaczenie zawartości metali ciężkich w materia-*

le biologicznym otrzymanym z Zatoki Puckiej, Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław, 1979. Materiały konferencyjne, str. 348.

Studia chemiczne ukończyłem w 1982 r. wykonując pracę magisterską dotyczącą potencjometrycznych i spektrofotometrycznych badań *N*-tlenków heterocyklicznych amin i ich nadchloranów w acetonitrylu. Była to praca eksperymentalna z zakresu chemii nieorganicznej zrealizowana w ówczesnym Zespole Środowisk Niewodnych. Z jej tematyką wiążą się moje dwie pierwsze publikacje (z listy JCR):

1. L. Chmurzyński, Z. Pawlak, H. Myszka, *Ultraviolet absorption spectra of pyridinium N-oxide perchlorates in acetonitrile*, J. Mol. Struct., **80** (1982) 235-242. (IF = 2,011)
2. L. Chmurzyński, Z. Pawlak, H. Myszka, *Ultraviolet absorption spectra of 2-, 3- and 4-picoline N-oxide perchlorates in acetonitrile*, Pol. J. Chem., **59** (1985) 639-642. (IF = 0,393)

Bezpośrednio po studiach magisterskich rozpocząłem studia doktoranckie wykonując pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Zygryda Smiatacza w Zakładzie Chemii Cu-krów. Rozprawę doktorską – „Budowa i właściwości produktów reakcji chlorków *O*-acetylo-2-deoksy-2-nitroso-*D*-glikopiranozyli z pirazolem i pochodnymi hydroksyaminokwasów” obroniłem w grudniu 1986 r. Dotyczyła ona syntezy glikozydów pirazolu oraz L-hydroksyaminokwasów metodą Lemieux, a jej pokłosiem jest kolejnych pięć publikacji z lat 1986-90 (z listy JCR):

1. Z. Smiatacz, R. Szweda, H. Myszka, *The structure and properties of the products of reaction between 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2-nitroso- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl chloride and pyrazole*, Carbohydr. Res., **153** (1986) 33-43. (IF = 2,074)
2. Z. Smiatacz, H. Myszka, Z. Ciunik, *Configuration and conformation of the products of reaction of 3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-2-nitroso- $\beta$ -*D*-arabinopyranosyl chloride with pyrazole*, Carbohydr. Res., **172** (1988) 171-182. (IF = 2,074)
3. Z. Smiatacz, H. Myszka, *Chemical modification of 1-(3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-2-hydroxyimino- $\alpha$ - and - $\beta$ -*D*-erythro-pentopyranosyl)pyrazole at C-2 and C-3*, Carbohydr. Res., **186** (1989) 335-340. (IF = 2,074)
4. Z. Ciunik, H. Paulsen, P. Luger, Z. Smiatacz, H. Myszka, *Structures of two 2-oxyimino- $\alpha$ -*D*-pyranosides*, Acta Cryst., **B45** (1989) 512-518. (IF = 6,467)
5. Z. Smiatacz, H. Myszka, *The synthesis, structure, and chemical transformation of methyl esters of O-(3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-2-hydroxyimino-*D*-erythro-pentopyranosyl)-*N*-tosyl-L-serine, -L-threonine, and -L-tyrosine*, Carbohydr. Res., **196** (1990) 167-174. (IF = 2,074)

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora, a nie wchodzące w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego, dotyczą syntezy i badań biologicznie czynnych glikozydów.

Można je podzielić na następujące grupy tematyczne:

- modyfikacje glikozydów L-hydroksyaminokwasów (L-seryny, L-treoniny i L-tyrozyny) posiadających grupę hydroksyiminową przy atomie węgla C-2;



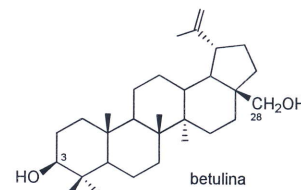
- otrzymywanie i modyfikowanie wybranych (3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-hydroksyimino- $\alpha$ -D-arabino-heksopiranozydo)uronianów metylu;
- wpływ ugrupowania hydroksyiminowego na stabilność 2-deoksy-2-hydroksyimino- $\alpha$  i  $\beta$ -D-heksopiranozydów;
- badania struktury krystalograficznej *N*-arylo-*N*-pentopiranozyloamin oraz analiza konformacyjna *N*-( $\alpha$ -D-glukofuranurono-6,3-laktanu)- i *N*-( $\beta$ -D-glukopiranouronianu metylu)-*p*-nitroaniliny;
- badania konformacyjne 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydu diosgenylu metodą półempiryczną PM3 wspartą obliczeniami DFT;
- $\beta$ -D-glukopiranozydy flawonylu jako wskaźniki aktywności  $\beta$ -glukozydazy.

Z wyżej wymienioną tematyką wiąże się dziewięć kolejnych publikacji (listy JCR):

1. Z. Smiatacz, H. Myszka, A. Dąbrowska, *Preparation of the 2-amino-D-galacto and D-talo-O-pyranosyl derivatives of L-serine, L-threonine, and L-tyrosine from corresponding 2-hydroxyimino-D-lyxo-hexopyranosyl derivatives*, Bull. Pol. Ac. Sci. Chem., **39** (1991) 105-111. (IF = 0,143)
2. P. Dokurno, J. Łubkowski, H. Myszka, Z. Smiatacz, *Crystal structures of N-aryl-N-pentopyranosylamines*, Zeitschr. für Kristallogr., **209** (1994) 808-812. (IF = 1,310)
3. Z. Smiatacz, I. Chrzczanowicz, H. Myszka, P. Dokurno, *The synthesis and structure of selected methyl (3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-2-hydroksyimino-D-arabino-hexopyranosid)uronates*, J. Carbohydr. Chem., **14** (1995) 723-735. (IF = 0,629)
4. Z. Smiatacz, I. Chrzczanowicz, H. Myszka, *Chemical modification of some methyl (3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-2-hydroksyimino- $\alpha$ -D-arabino-hexopyranosid)uronates*, Carbohydr. Res., **298** (1997) 341-346. (IF = 2,074)
5. A. Nowacki, H. Myszka, B. Liberek, *Conformational studies of diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosides at the PM3 and DFT levels of theory*, Carbohydr. Res., **377** (2013) 4-13. (IF = 2,074)
6. M. Norkowska, H. Myszka, M. Cyman, D. Grzywacz, D. Trzybiński, A. Sikorski, B. Liberek, *2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-gluconic acid: crystal structure and application in the synthesis of N-(D-gluconyl) derivatives of D-glucosamine*, J. Carbohydr. Chem., **33** (2014) 33-47. (IF = 0,629)
7. I.E. Serdiuk, M. Reszka, H. Myszka, K. Krzymiński, B. Liberek, A.D. Roshal, *Flavonol-based fluorescent indicator for determination of  $\beta$ -glucosidase activity*, RSC Adv., **6** (2016) 42532-42536. (IF = 2,936)
8. M. Cyman, J. Wielińska, H. Myszka, D. Trzybiński, A. Sikorski, A. Nowacki, B. Liberek, *Influence of the oxime and anomeric configurations on the stability of 2-deoxy-2-hydroksyimino-D-hexopyranosides*, J. Mol. Struct., **1125** (2016) 558-569. (IF = 2,011)
9. D. Walczak, A. Nowacki, D. Trzybiński, J. Samaszko-Fiertek, H. Myszka, A. Sikorski, B. Liberek, *Conformational studies of N-( $\alpha$ -D-glucofuranurono-6,3-lactone)- and N-(methyl  $\beta$ -D-glucopyranuronate)-*p*-nitroanilines*, Carbohydr. Res., **446-447** (2017) 85-92. (IF = 2,074)

## 5.1. Plany na przyszłość

Aktualnie zajmuję się syntezą nowych glikozydów, które zbudowane są z reszty betuliny oraz D-glukozaminy i D-galaktozaminy. Betulina należy do pentacyklicznych związków triterpenowych typu lupanu, obok lupeolu i kwasu betulinowego. Jest jednym z powszechniej występujących triterpenoidów w przyrodzie. Występuje w wielu gatunkach roślin, a na skalę przemysłową izolowana jest z kory brzozy. Betulina wykazuje dużą aktywność biologiczną (przeciwwirusową, antyoksydacyjną, przeciwzapalną i przeciwmiażdżycową oraz przeciwnowotworową) co sprawia, że przyczynia się do poprawy funkcjonowania organizmu ludzkiego. Nie jest toksyczna, co czyni ją substancją, która ma olbrzymi potencjał przy produkcji różnych preparatów leczniczych, kosmetycznych czy spożywczych.



Betulinę łatwo glikozyluje się, przy czym pierwszorzędowa grupa hydroksylowa przy atomie węgla C-28 ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) łatwiej ulega reakcji glikozylowania niż drugorzędowa grupa  $-\text{OH}$  przy atomie węgla C-3. W naturze nie występują glikozydy zawierające wyżej wymienione dwa aminocukry.

W trakcie opracowania są warunki regioselektywnego sprzęgania betuliny z D-glukozaminą i D-galaktozaminą. Zamierzam także prowadzić modyfikacje w obrębie grupy aminowej w uzyskanych glikozaminozydach. Przeprowadzone zostaną również badania przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe zsyntezowanych związków. Wstępne wyniki otrzymane przeze mnie w kwestii aktywności przeciwnowotworowej glikozydów betuliny są bardzo obiecujące. Na razie tej tematyce poświęcone są trzy prace dyplomowe (licencjacka i dwie magisterskie) realizowane pod moim kierunkiem.

Badania prowadzone są we współpracy z Wydziałem Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie.

Planuję także zsyntezować i badać glikozydy diosgeniny i betuliny z kwasem D-glukuronowym. Obecność grupy karboksylowej w części cukrowej saponiny może w zasadniczy sposób wpłynąć na właściwości tego rodzaju glikozydów. Grupa karboksylowa stwarza również duże możliwości modyfikowania tego typu połączeń.

Henryk Mysza