



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Załącznik nr 2A do wniosku o wszczęcie
postępowania habilitacyjnego z dnia 24.04.2019 roku

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

ul. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz

Tel. (052) 585-39-36

e-mail: kizchemorg@cm.umk.pl

AUTOREFERAT

Renata Studzińska

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.....	3
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 poz. 882 ze zm. w Dz. U. 2016 poz. 1311).....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
4.3.1. Wprowadzenie.....	5
4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia.....	10
4.3.3. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	11
4.3.4. Perspektywy badawcze związane z osiągnięciem naukowym	33
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	34
5.1. Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora	34
5.2. Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora	37
6. Literatura cytowana.....	41

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: **Renata Studzińska**

Miejsce pracy: **Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz**

Dane kontaktowe: **rstud@cm.umk.pl**

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

- doktor nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, 8.02.2005.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Otrzymywanie nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, promotor: prof. dr hab. Marcin Damiński

- magister inżynier, specjalność: technologia chemiczna, Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, 23.07.1997.

Tytuł pracy magisterskiej: Badanie właściwości fizyko-mechanicznych mieszanin różnych typów polietylenów, promotor: dr Kazimierz Piszczek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1.10.2014 – do chwili obecnej

Pracownik naukowo-dydaktyczny, Asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

od 1.06.2006 do 30.09.2014

Pracownik naukowo-dydaktyczny, Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

1.11.1997 – 31.05.2006

Pracownik naukowo-dydaktyczny, Asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

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 poz. 882 ze zm. w Dz. U. 2016 poz. 1311)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Badania nad syntezą nowych pochodnych tiazolonu i tiazolopirymidynonu oraz możliwością ich wykorzystania jako selektywnych inhibitorów dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny obejmuje **6** oryginalnych prac twórczych o łącznej punktacji: **IF – 13.79** i **MNiSW – 145**. W każdej z prac jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

P1. Studzińska R., Wróblewski M., Karczmarzka-Wódzka A., Kołodziejska R.: A facile synthesis of the novel thiazolo[3,2-*a*]pyrimidine derivatives. *Tetrahedron Lett.* 2014, 55, 1384-1386. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.01.033

IF: **2.379**, MNiSW: **25.000**

P2. Studzińska R., Kołodziejska R., Kosmalski T., Modzelewska-Banachiewicz B.: Regioselective bromination of 2-idomethyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pyrimidin-5-one. *Heterocycles*, 2016, 92(12), 2271-2277. DOI: 10.3987/COM-16-13592

IF: **0.805**, MNiSW: **20.000**

P3. Studzińska R., Karczmarzka-Wódzka A., Kozakiewicz A., Kołodziejska R., Paprocka R., Wróblewski M., Augustyńska B., Modzelewska-Banachiewicz B.: 2-Allylaminothiazole and 2-allylaminodihydrothiazole derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of bioactivity. *Monatsh. Chem.*, 2015, 146, 1673-1679. DOI: 10.1007/s00706-015-1539-z

IF: **1.131**, MNiSW: **25.000**

P4. Studzińska R., Kołodziejska R., Kupczyk D., Płaziński W., Kosmalski T.: A novel derivatives of thiazol-4(5*H*)-one and their activity in the inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Bioorg. Chem.*, 2018, 79, 115-121. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.04.014
IF: 3.929, MNiSW: 25.000

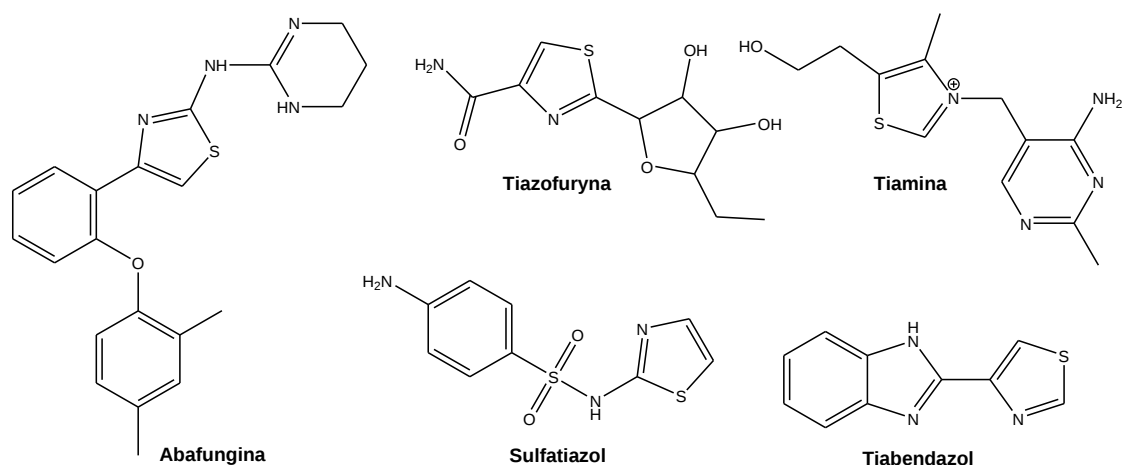
P5. Studzińska R., Kołodziejska R., Płaziński W., Kupczyk D., Kosmalski T., Jasieniecka K., Modzelewska-Banachiewicz B.: Synthesis of the *N*-methyl derivatives of 2-aminothiazol-4(5*H*)-one and their interactions with 11 β HSD1 - molecular modeling and *in vitro* studies. *Chem. Biodivers.*, 2019, DOI: 10.1002/cbdv.201900065
IF: 1.617, MNiSW: 25.000

P6. Studzińska R., Kupczyk D., Płazińska A., Kołodziejska R., Kosmalski T., Modzelewska-Banachiewicz B.: Thiazolo[3,2-*a*]pyrimidin-5-one derivatives as a novel class of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 2018, 81, 21-26. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.07.033
IF: 3.929, MNiSW: 25.000

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

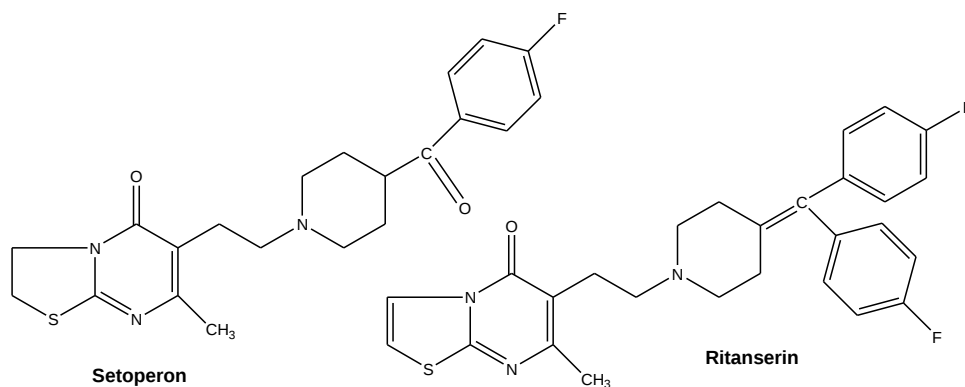
Związki, których fragmentem strukturalnym jest pierścień tiazolu odgrywają istotną rolę ze względu na ich aktywność biologiczną. Znanych jest wiele leków zawierających pierścień tiazolowy, m.in. sulfatiazol (działanie bakteriostatyczne), abafungina (działanie przeciwgrzybicze), tiabendazol (działanie przeciwwrobacze), tiamina (witamina B₁), czy stosowana w leczeniu nowotworów tiazofuryna (Schemat 1).



Schemat 1. Wybrane leki zawierające pierścień tiazolowy.

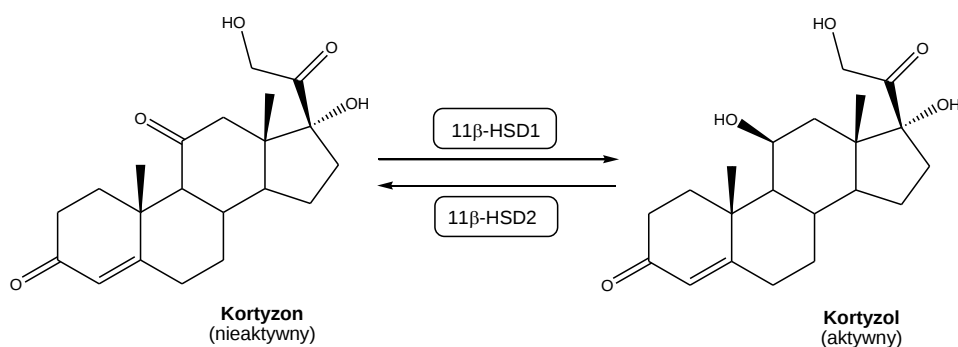
Pochodne tiazolonu wykazują m.in. działanie przeciwnowotworowe (*Chen i wsp.*, 2007), przeciwbakteryjne (*Dabholkar i wsp.*, 2015) i przeciwvirusowe (*Al.-Ansary i wsp.*, 2013). Badane były również w kierunku selektywnej inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej (*Scott i wsp.*, 2014; *Jean i wsp.*, 2007; *Johansson i wsp.* 2008; *Yuan i wsp.*, 2007).

Na uwagę zasługują również związki, w których pierścień tiazolowy jest skondensowany z innym pierścieniem aromatycznym, zwłaszcza zawierającym heteroatomy. Jednym z takich układów są tiazolopirymidyny, w których pierścienie tiazolowy i pirymidynowy mogą być połączone w różny sposób. Układy zawierające skondensowane pierścienie tiazolowy i pirymidynowy, m.in. tiazolo[3,2-*a*]pirymidyny odgrywają istotną rolę w organizmach ze względu na ich aktywność biologiczną. Najbardziej znanymi przedstawicielami tej grupy związków są: setoperon - antagonist receptorów 5HT₂ serotoniny oraz receptorów D₂ dopaminy, stosowany w leczeniu pacjentów z chroniczną schizofrenią (*Den Boyer i wsp.*, 2000) oraz ritanserin - antagonist receptorów 5HT₂ serotoniny – Schemat 2 (*Kennis i wsp.*, 1985). Inne tiazolo[3,2-*a*]pirymidyny badane były pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej (*Pecorari i wsp.*, 1991), przeciwvirusowej (*Danel i wsp.*, 1998; *Ram i wsp.*, 1987), przeciwbólowej (*Seperic i wsp.*, 1972), a także przeciwnadciśnieniowej (*Russo i wsp.*, 1993).



Schemat 2. Ritanserin i setoperon jako przykłady biologicznie aktywnych związków zawierających układ tiazolopirymidynowy.

Dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa typu 1 (11 β -HSD1, reduktaza kortyzonu) jest enzymem mikrosomalnym. To NADPH-zależna oksydoreduktaza o wysokiej ekspresji w wątrobie, tkance tłuszczowej i mózgu. Katalizuje ona przemianę nieaktywnego kortyzonu w aktywny fizjologicznie kortyzol oraz w mniejszym stopniu reakcję odwrotną. Razem z izoformą 2 - dehydrogenazą 11 β -hydroksysteroidową typu 2 (11 β -HSD2), znajdującą się głównie w nerkach i okrężnicy, tworzy układ regulujący poziom kortyzolu w organizmie (Schemat 3).



Schemat 3. Fizjologiczna rola dwóch izoform dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej.

Kortyzol jest hormonem należącym do glukokortykoidów, które regulują szlaki związane ze stresem i sygnalizacją metaboliczną. Przewlekły nadmiar kortyzolu we krwi prowadzi do charakterystycznego przemieszczenia się depozytów tkanki tłuszczowej (bawoli kark, twarz księżyc w pełni, otyłość brzuszna), ścieńczenia skóry, powstania rozstępów o charakterystycznej różowej barwie, trądziku oraz insulinooporności, co stanowi obraz zespołu Cushinga (*Sharma i wsp., 2015*). Zespół Cushinga, inaczej hiperkortyzolizm lub pierwotna nadczynność kory nadnerczy, to choroba, w przebiegu której kora nadnerczy

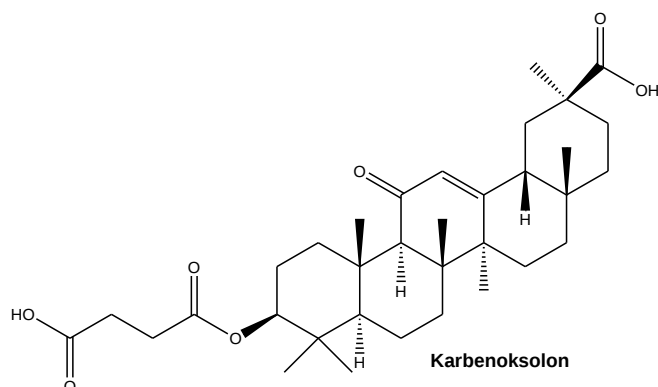
w nadmiernych ilościach wydziela hormony sterydowe, czyli glikokortykosteroidy. W konsekwencji dochodzi do pojawienia się złożonych objawów związanych z wieloma układami w organizmie.

Nadmiar kortyzolu powoduje również pojawienie się objawów charakterystycznych dla zespołu metabolicznego tj. otyłość trzewna, oporność na insulinę, cukrzyca, dyslipidemia, nadciśnienie i hiperurykemia (Navarrete-Vázquez i wsp., 2014). Zespół metaboliczny (MetS) jest złożonym zaburzeniem definiowanym przez grupę połączonych czynników, które zwiększają ryzyko chorób miażdżycowych układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy typu 2.

Zwiększona ekspresja 11 β -HSD1 wiąże się z patogenezą zaburzeń gospodarki lipidowej, jak również insulinooporności. Hamowanie aktywności dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1 powoduje zmniejszenie poziomu kortyzolu, a tym samym zmniejszenie masy tkanki tłuszczowej. Sugeruje się również, że związki specyficznie hamujące 11 β -HSD1 u pacjentów z cukrzycą typu 2 mogą obniżać stężenie glukozy we krwi, a przez to wpływać na zmniejszenie insulinooporności i otyłości centralnej (Böhme i wsp., 2013). Badania wykazały, iż związki hamujące 11 β -HSD1 prowadzą do zredukowania glikogolizy oraz obniżenia poziom cholesterolu całkowitego (Andrews i wsp., 2003). W ostatnich latach podejmuje się próby zastosowania inhibitorów 11 β -HSD1 w celach terapeutycznych, które docelowo mogą być wykorzystane w leczeniu cukrzycy typu 2 (Anderson i wsp., 2013).

Znanym inhibitorem 11 β -HSD1 jest karbenoksolon (Schemat 4). Jest to pochodna kwasu glicyryzynowego, naturalnego produktu znajdującego się w korzeniu lukrecji. Karbenoksolon nie działa wybiórczo tylko na 11 β -HSD1, jest również (choć w mniejszym stopniu) inhibitorem dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 2 (Diederich i wsp., 2000). Izoforma 2 (11 β -HSD2), w przeciwieństwie do 11 β -HSD1 jest NAD⁺- zależna, umożliwia utlenianie kortyzolu do nieaktywnego kortyzonu, a tym samym chroni tkanki z receptorami mineralokortykosteroidowymi przed działaniem kortyzolu. Hamowanie 11 β -HSD2 może prowadzić do nadciśnienia, poprzez aktywację receptora mineralokortykoidowego w nerkach, jak również w wyniku zmniejszenia ekspresji genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu. Ma to szczególne znaczenie w przypadku pacjentów z cukrzycą typu 2 i innymi elementami zespołu metabolicznego (Kotelevtsev i wsp., 1999). Ponadto, nadmiar mineralokortykosteroidów oraz rzekomy hiperaldosteronizm wywołany przyjmowaniem karbenoksolonu może powodować obrzęki obwodowe, hipokaliemię oraz

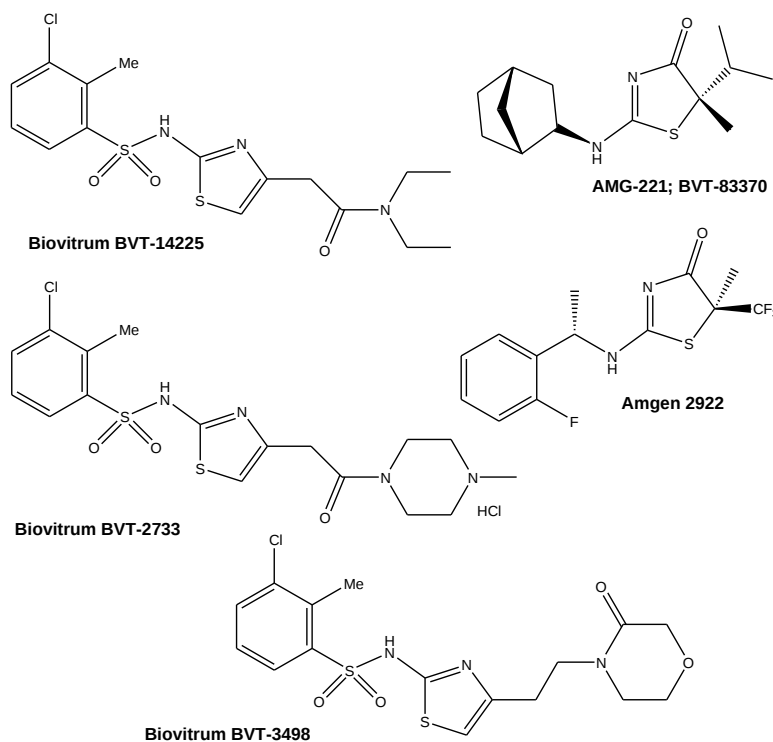
zasadowicę metaboliczną. Nieselektywne działanie karbenoksolonu wpływa na ograniczony zakres jego zastosowania klinicznego, co skłania do poszukiwania nowych związków - selektywnych inhibitorów 11 β -HSD1.



Schemat 4. Karbenoksolon - znany inhibitor 11 β -HSD1.

Prowadzone wcześniej badania nad poszukiwaniem selektywnych inhibitorów 11 β -HSD1, skierowane były między innymi na grupę związków zawierających pierścień tiazolowy. 4-Podstawione pochodne 2-aminotiazolu: Biovitrum BVT-2733, Biovitrum BVT-14225 i Biovitrum BVT-3498 (Schemat 5) to substancje wykazujące aktywność w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1 (Scott *i wsp.*, 2014; Barf *i wsp.*, 2002; Fotsch *i wsp.*, 2008; Hale *i wsp.*, 2008). Podobnie jednak jak karbenoksolon, związki te działają również hamująco na 11 β -HSD2.

Wysoce selektywnymi inhibitorami 11 β -HSD1 okazały się za to pochodne 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu, m.in. Amgen 2922 oraz AMG-221 (BVT-83370) (Schemat 5) (Scott *i wsp.*, 2014; Jean *i wsp.*, 2007; Johansson *i wsp.* 2008; Yuan *i wsp.*, 2007). AMG-221 (BVT-83370) pomyślnie przeszedł fazę I badań klinicznych. Związek ten badano na grupie osób otyłych i pomimo dobrych rokowań (IC_{50} = 0.975 ng/mL i maksymalnym stopniu hamowania enzymu w tkankach tłuszczowych wynoszącym I_{max} = 1,19 ng/mL) w 2011 roku badania nad wdrożeniem tego związku jako leku zostały przerwane.



Schemat 5. Inhibitory 11β-HSD1 zawierające pierścień tiazolu i dihydrotiazolu.

4.3.2. Cel naukowy osiągnięcia

Głównym celem badań było zsyntetyzowanie nowych, nieopisanych dotąd w literaturze związków heterocyklicznych, pochodnych tiazolonu i tiazolopirymidynonu o potencjalnej aktywności biologicznej oraz ocena przydatności ich zastosowania jako selektywnych inhibitorów dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej typu 1. Podjęcie badań nad syntezą nowych pochodnych oraz ich aktywnością daje szansę na wykrycie selektywnego inhibitora tego enzymu, a tym samym na odnalezienie w przyszłości skutecznego leku, który mógłby być stosowany w leczeniu zespołu Cushinga, zespołu metabolicznego oraz cukrzycy typu 2.

Badania były ukierunkowane na:

- Syntezę nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu o potencjalnej aktywności biologicznej oraz ich identyfikację metodami spektroskopowymi.
- Syntezę nowych *N*-podstawionych pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu oraz ich identyfikację metodami spektroskopowymi.

- Zbadanie aktywności otrzymanych pochodnych w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1 i typu 2 w celu oceny selektywności potencjalnych inhibitorów.

4.3.3. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Synteza pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu

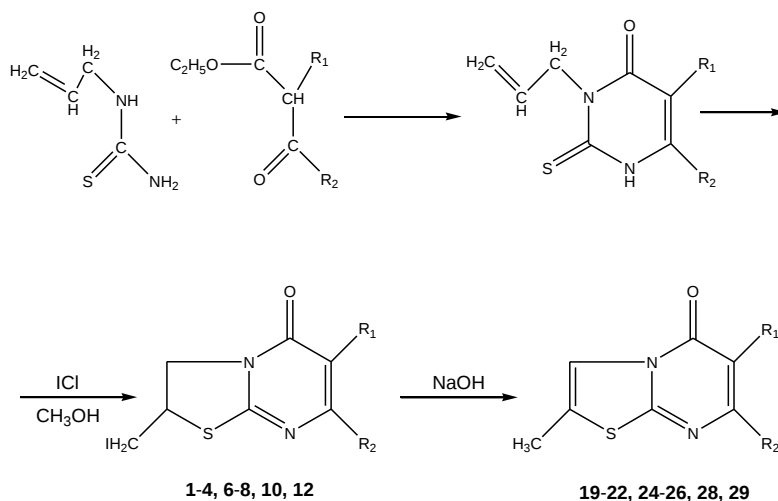
Ze względu na to, że pochodne tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu stanowią przedmiot 3 publikacji, poniżej zamieszczono zestawienie wszystkich otrzymanych pochodnych z przypisaną im numeracją, która konsekwentnie będzie stosowana w niniejszym opisie (Tabela 1).

Tabela 1. Pochodne tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu.

Pochodne 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2- <i>a</i>]pirymidyn-5-onu	Pochodne 2-bromometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2- <i>a</i>]pirymidyn-5-onu	Pochodne 2-metylotiazolo[3,2- <i>a</i>]pirymidyn-5-onu
1 -(CH ₂) ₃ - 2 -(CH ₂) ₄ - 3 -(CH ₂) ₅ - 4 H CH ₃ 5 NO ₂ CH ₃ 6 H H 7 CH ₃ CH ₃ 8 CH ₃ H 9 Br CH ₃ 10 H C ₂ H ₅ 11 Br H 12 H CH ₂ C-C ₆ H ₁₁	13 H CH ₃ 14 NO ₂ CH ₃ 15 CH ₃ CH ₃ 16 CH ₃ H 17 Br CH ₃ 18 Br H	19 -(CH ₂) ₃ - 20 -(CH ₂) ₄ - 21 -(CH ₂) ₅ - 22 H CH ₃ 23 NO ₂ CH ₃ 24 H H 25 CH ₃ CH ₃ 26 CH ₃ H 27 Br CH ₃ 28 H C ₂ H ₅ 29 H CH ₂ C-C ₆ H ₁₁

Już podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej przedmiotem moich badań była synteza pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, zawierających skondensowane pierścienie pirymidynowy i tiazolowy [Załącznik numer 3, II.A.a.1]. Związki te otrzymywałam w kilku etapach. Pierwszy z nich, to reakcja kondensacji *N*-allilotiomocznika

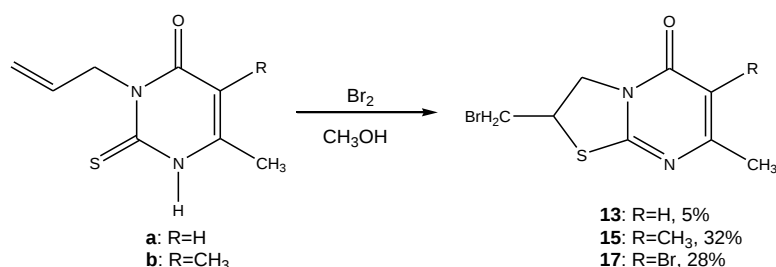
z odpowiednimi β -oksoestrami, prowadząca do otrzymania pochodnych 3*N*-allilo-2-tiouracylu. W kolejnym etapie prowadziłam zamykanie pierścienia tiazolowego w tych pochodnych w reakcji z chlorkiem jodu w metanolu, w wyniku którego otrzymałam szereg pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Ostatni etap to eliminacja jodowodoru, prowadząca do otrzymania pochodnych 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (Schemat 6).



Schemat 6. Synteza pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu i 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu.

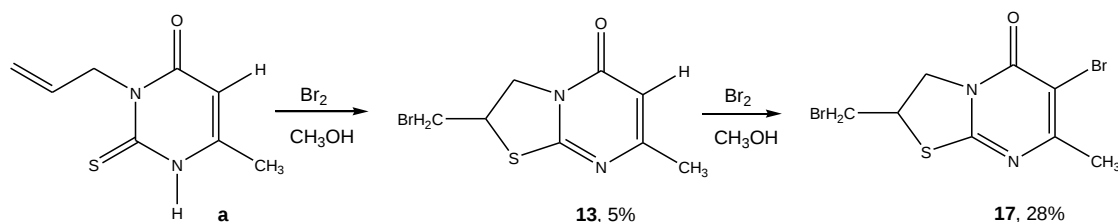
Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam prace badawcze nad syntezą nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Skupiłam się jednak na syntezie pochodnych, zawierających grupę metylową w położeniu 7. Badania te podzielić można na dwa obszary. Z jednej strony postanowiłam przeprowadzić reakcje zamykania pierścienia tiazolowego w pochodnych 3*N*-allilo-2-tiouracylu, przy użyciu bromu, drugi obszar obejmował badania nad modyfikacją pierścienia pirymidynowego, zarówno w 2-jodometylo-, jak i 2-bromometylopo pochodnych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w [**Publikacja P1**].

Przeprowadzenie reakcji cyklizacji 3*N*-allilo-5,6-dimetylo-2-tiouracylu (a) i 3*N*-allilo-6-metylo-2-tiouracylu (b) pozwoliło uzyskać 3 nowe pochodne 2-bromometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (13, 15, 17), zawierające podstawniki metylowe w położeniu 6 i (lub) 7 (Schemat 7). Reakcje te prowadzone były w metanolu w temperaturze wrzenia. W przypadku zastosowania związku **b jako substratu otrzymano 2-bromometylo-6,7-dimetylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (15) z izolowaną wydajnością 32%.**



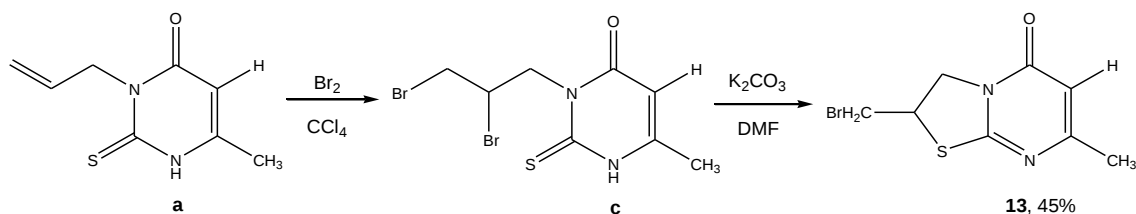
Schemat 7. Zamykanie pierścienia tiazolowego w reakcji pochodnych 3*N*-allilo-2-tiouracylu z bromem.

Analogiczną reakcję przeprowadzono, stosując jako substrat 3*N*-allilo-6-metylo-2-tiouracyl (**a**). Jednak w tym przypadku, zachodziły równoległe dwie reakcje: cyklizacja pierścienia tiazolowego oraz elektrofilowe podstawienie bromu w położeniu 6 układu tiazolopirymidynowego. W konsekwencji, głównym produktem reakcji był 2-bromometylo-6-bromo-7-metylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (**17**), natomiast 2-bromometylo-7-metylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (**13**), wyizolowano z niewielką wydajnością (5%) (Schemat 8).



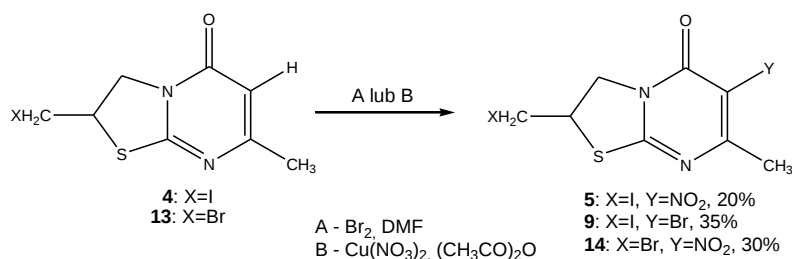
Schemat 8. Dwuetapowa reakcja otrzymywania 2-bromometylo-6-bromo-7-metylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**17**).

Ze względu na niską wydajność reakcji cyklizacji, wynikającą z konkurencyjnego podstawienia elektrofilowego, związek **13** zsyntetyzowano również w dwuetapowej syntezie, zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (*Shiau i wsp., 1990*). Pierwszy etap to addycja bromu do podwójnego wiązania grupy allilowej. W etapie drugim prowadzono zamknięcie pierścienia tiazolowego w obecności węgla potasu (K_2CO_3) w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF) (Schemat 9). Zmiana warunków prowadzenia reakcji spowodowała znaczny wzrost wydajności końcowego produktu reakcji (do 45%), pomimo zastosowania dwóch etapów syntezy i izolowania produktu pośredniego **c**.



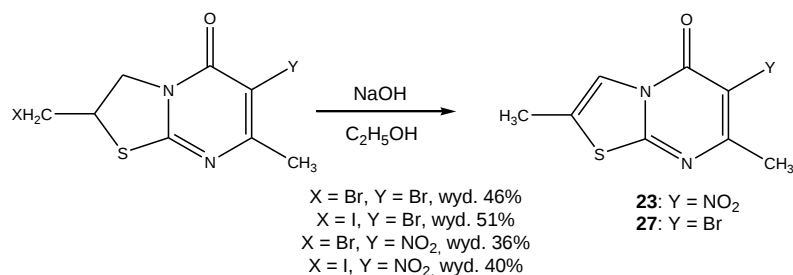
Schemat 9. Dwuetapowa synteza 2-bromometylo-7-metylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**13**).

Możliwość bezpośredniego wprowadzenia dodatkowej grupy funkcyjnej do pierścienia heterocyklicznego jest istotna z punktu widzenia modyfikacji istniejącego już związku, a tym samym zmiany jego właściwości, również w zakresie aktywności biologicznej. Ze względu na częściowo aromatyczny charakter układu tiazolopirymidynowego, postanowiłam sprawdzić w jaki sposób układ ten zachowuje się w reakcji substytucji elektrofilowej. W tym celu przeprowadziłam reakcje nitrowania 2-jodometylo- i 2-bromometylo-7-metylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**4**, **13**) oraz reakcję bromowania pochodnej **4** (Schemat 10). Wyniki tych eksperymentów stanowią część publikacji [**Publikacja P1**]. Reakcje nitrowania prowadzono za pomocą $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ w bezwodniku octowym w temperaturze pokojowej, wg procedury, która wcześniej stosowana była dla pochodnych uracylu (Giziewicz i wsp., 1999), natomiast reakcję bromowania prowadziliśmy z bromem w DMF w temperaturze 100 °C (wg Shiau i wsp., 1990). Prowadzone reakcje wykazały, że substytucja elektrofilowa w układach 2-halogenometylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu zachodzi w położeniu 6, w związku z tym, w reakcji nitrowania otrzymano pochodne **5** i **14**, natomiast w wyniku bromowania powstał związek **9**.



Schemat 10. Reakcje podstawienia elektrofilowego w pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu.

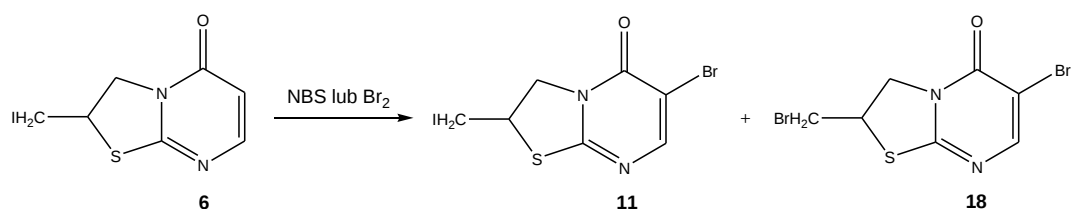
Kolejne pochodne 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu **23** i **27** otrzymano w reakcji eliminacji jodowodoru z jodometylopo pochodnych **5** i **9** oraz eliminacji bromowodoru z bromometylopo pochodnych **14** i **17** (Schemat 11).



Schemat 11. Synteza 6-nitro- (**23**) i 6-bromo-2,7-dimetylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**27**).

Podsumowując, w wyniku prowadzenia badań nad syntezą nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, których efektem jest publikacja [*Publikacja P1*], otrzymano 8 nowych pochodnych: 3 poprzez zamykanie pierścienia tiazolowego w pochodnych 3*N*-allilo-2-tiouracylu, 3 w wyniku badań nad substytucją elektrofilową w układzie 2,3-dihydrotiazolopirymidynowym oraz 2 w wyniku reakcji eliminacji jodowodoru lub bromowodoru z 6-bromo/nitro-2-halogenometylo-7-metylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Wszystkie otrzymane związki przebadano następnie w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej.

W dalszym etapie badań nad substytucją elektrofilową w układach tiazolo[3,2-*a*]pirymidynowych, zbadalam zachowanie się 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu nie zawierającego podstawników w położeniu 6 i 7 wobec dwóch czynników bromujących: Br₂ i NBS. Wyniki tych badań zostały opublikowane w [*Publikacja P2*]. W reakcjach substytucji opisanych wcześniej w [*Publikacja P1*], jako związki wyjściowe zastosowano pochodne z podstawnikiem metylowym w położeniu 7, który uniemożliwiał podstawienie atomu bromu w tym miejscu. Prowadząc badania z wykorzystaniem niepodstawionej pochodnej, spodziewalam się otrzymać dwa izomery w reakcji bromowania, różniące się położeniem atomu bromu (w pozycji 6 lub 7). Nieoczekiwanie w wyniku przeprowadzonych reakcji nie udało się otrzymać 7-bromopochodnej. W zależności od zastosowanych warunków uzyskano 2 produkty: 6-bromo-2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (**11**) i 6-bromo-2-bromometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (**18**) z różnymi wydajnościami (Schemat 12).



Schemat 12. Bromowanie 2-jodometylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**6**).

W przypadku zastosowania NBS, jako czynnika bromującego, w klasycznych rozpuszczalnikach (acetonitryl, THF), reakcja podstawienia elektrofilowego zachodziła selektywnie, a głównym produktem reakcji była pochodna **11**. Zastosowanie cieczy jonowej [BMIM]PF₆ (heksafluorofosforanu 1-butylo-3-metyloimidazoliowego) jako rozpuszczalnika powodowało spadek regioselektywności reakcji i wzrost udziału produktu **18** w mieszaninie reakcyjnej (Tabela 2). **Związek 18, powstały w wyniku zachodzenia równocześnie dwóch reakcji: substytucji elektrofilowej w położeniu 6 i substytucji nukleofilowej w grupie 2-jodometylowej jest głównym produktem reakcji bromowania za pomocą NBS prowadzonej w [BMIM]Br (bromku 1-butylo-3-metyloimidazoliowym) oraz w reakcjach bromowania z zastosowaniem bromu, niezależnie od użytego rozpuszczalnika.**

Tabela 2. Udział produktów bromowania 2-jodometylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu w zależności od użytego czynnika bromującego i rozpuszczalnika.

Czynnik bromujący	Rozpuszczalnik	Czas [h]	Konwersja ^a [%]	Udział produktu ^a [%]	
				11	18
NBS	AcCN	2,5	97,6	92,2	7,8
	THF	5	77,5	86,8	13,2
	[BMIM]PF ₆	1	70,3	57,3	41,7
	[BMIM]Br ^b	1	85,1	1,9	98,1
Br ₂	DMF	1	55,4	2,7	97,3
	AcCN	1	92,6	4,0	96,0
	THF	1,5	51,5	17,9	82,1
	[BMIM]PF ₆	1	100,0	3,9	96,1
	[BMIM]Br ^b	1	100,0	0,0	100,0

^a Konwersja oraz udział produktów wyznaczone zostały za pomocą HPLC, ^b 70 °C

Do badań nad inhibicją dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej opisanych w publikacji [**Publikacja P5**] wykorzystano również 3 nowe pochodne zawierające układ tiazolopirymidynowy, których synteza nie została opublikowana wcześniej. Są to: 2-jodometylopochodna **10** i 2-metylopochodna **28**, otrzymane wg procedur opisanych w [Załącznik numer 3, II.A.a.1] a także 2-bromometylopochodna **16**, otrzymana analogicznie do pochodnej **15** [**Publikacja P1**].

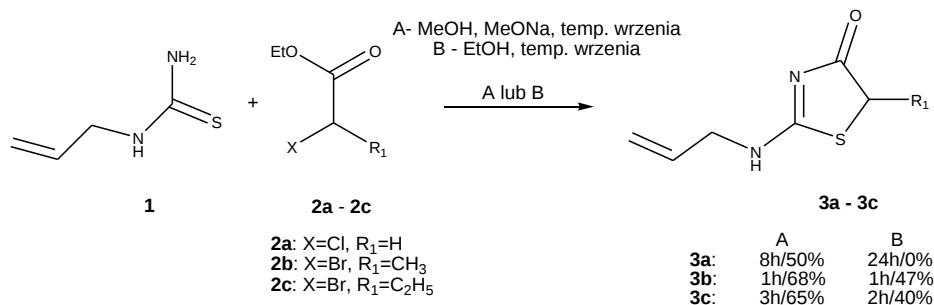
Synteza pochodnych 2-aminotiazol-4(5H)-onu

Jednym ze sposobów tworzenia pierścienia dihydrotiazolowego jest reakcja tiomocznika lub jego pochodnych z chlorowcokwasami. Reakcje tego typu opisywane wcześniej (Levshin i wsp., 1985), prowadzono w różnych rozpuszczalnikach: wodzie, pirydynie, benzenie i acetonitrylu, a produkty uzyskiwane były najczęściej w postaci halogenowodorków. W celu otrzymania dihydrotiazoli, halogenowodorki poddawano następnie działaniu zasady: węglanu sodu lub wodnego roztworu amoniaku.

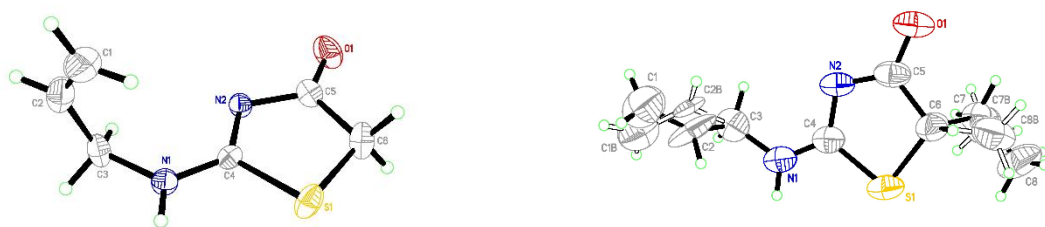
Ze względu na prowadzone przeze mnie wcześniej reakcje kondensacji *N*-allilotiomocznika z oksoestrami w środowisku zasadowym prowadzące do otrzymania pochodnych *N*-allilotiouracylu [Załącznik numer 3, II.A.a.1], zainteresowałam się możliwością prowadzenia reakcji chlorowcoestrów z *N*-allilotiomocznikiem w analogicznych warunkach. Pierwsze wyniki tych eksperymentów opublikowane zostały w [**Publikacja P3**].

Kondensację w środowisku zasadowym przeprowadzono dla 3 różnych chlorowcoestrów **2a** – **2c** (Schemat 13). Reakcja *N*-allilotiomocznika z chlorowcoestrami prowadzona była w metanolu z użyciem 10% nadmiaru estru i dwukrotnego nadmiaru metanolanu sodu. Reakcje prowadzono do całkowitego przereagowania *N*-allilotiomocznika (kontrola chromatograficzna TLC: octan etylu). **Pochodne 2-(alliloamino)tiazol-4(5H)-onu 3a – 3c, które w dalszym etapie poddane były badaniom w kierunku inhibicji 11 β -HSD, otrzymano z izolowaną wydajnością 50-68%. Dla porównania przeprowadzono analogiczne reakcje w środowisku obojętnym, w których otrzymano produkty 3b i 3c z niższą wydajnością, 40-47%. Natomiast w przypadku zastosowania estru 2a jako substratu, otrzymano jedynie śladowe ilości produktu 3a. W celu potwierdzenia, że reakcja pomiędzy *N*-allilotiomocznikiem i 2-halogenoestrami prowadzi do otrzymania odpowiednich pochodnych 2-alliloaminotiazol-4(5H)-onu a nie ich izomerów**

konstytucyjnych (pochodnych *N*-allilo-2-tioimidazol-4(5*H*)-onu), oprócz standardowych analiz spektroskopowych wykonano również analizę dyfrakcji rentgenowskiej, która potwierdziła strukturę otrzymanych produktów (Rysunek 1).



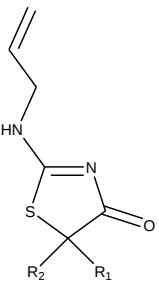
Schemat 13. Reakcja kondensacji *N*-alliliotiomocznika z 2-halogenoestrami.



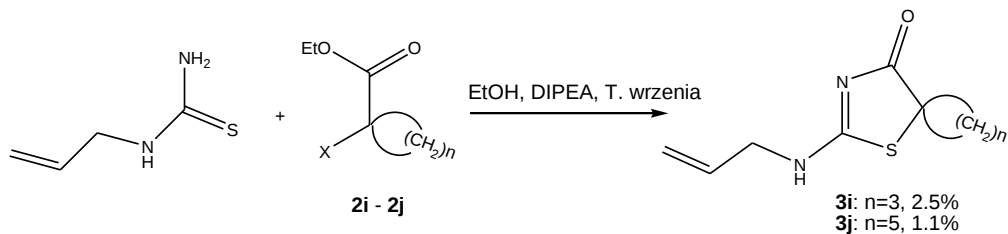
Rysunek 1. Struktury krystalograficzne produktów **3a** i **3c**.

Korzystając z metody opisanej powyżej, przeprowadzono reakcje *N*-alliliotiomocznika z innymi dostępnymi w handlu 2-halogenoestrami. Uzyskane wyniki stanowią fragment pracy [**Publikacja P4**]. Okazało się, że kondensacja w środowisku zasadowym jest skuteczna i wydajna jedynie w przypadku zastosowania do syntezy liniowych i rozgałęzionych 2-halogenoestrów alifatycznych oraz 2-arylohalogenoestrów. W związku z tym, metoda posłużyła do otrzymania 5 nowych pochodnych 2-(alliloamino)tiazol-4(5*H*)-onu, zawierających liniowe i rozgałęzione podstawniki alifatyczne w położeniu 5 (**3d** – **3f**) oraz pochodnych zawierających podstawniki fenyłowe przy C-5 (**3g** – **3h**) (Tabela 3), które w kolejnym etapie poddano badaniom w kierunku inhibicji 11β-HSD. Generalnie, wydajność uzyskanych pochodnych 2-(alliloamino)tiazol-4(5*H*)-onu była umiarkowanie wysoka i wynosiła powyżej 35%, jedynie w przypadku użycia trzeciorzędowego estru zaobserwowano znaczny spadek wydajności reakcji (wydajność produktu **3f** – 15%).

Tabela 3. Pochodne 2-(alliloamino)tiazol-4(5*H*)-onu **3d** – **3h** otrzymane w wyniku kondensacji *N*-allilotiomocznika z 2-halogenoestrami w środowisku zasadowym.

L.p.		R ₁	R ₂	Wydajność (%)	Temp. topn. (°C)
3d		H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	40	73-74
3e		H	CH(CH ₃) ₂	53	84-85
3f		CH ₃	CH ₃	15	75-76
3g		H	C ₆ H ₅	35	120-122
3h		H	C ₆ H ₄ <i>p</i> -Br	45	225-226

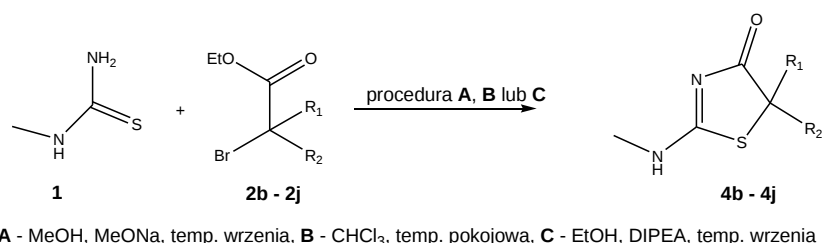
Próba zastosowania powyższej metody w celu otrzymania pochodnych tiazolonu zawierających układ spiro pierścieni tiazolowego i cykloalkanowego, w których atomem łącznikowym jest atom C-5 pierścienia tiazolowego, zakończyła się niepowodzeniem. Okazało się, że estry z podstawnikiem cyklobutylovym i cykloheksylovym w położeniu 2 nie reagują z *N*-allilotiomocznikiem w tych warunkach. Syntezy pochodnych tiomocznika z analogicznym estrem zawierającym pierścień cyklopentanowy prowadzone były wcześniej (Johansson i wsp., 2008) w obecności *N,N*-diizopropyletyloaminy i promieniowania mikrofalowego. Produkty uzyskiwano z wydajnością 20 - 35%. Ze względu na brak możliwości prowadzenia reakcji z zastosowaniem mikrofal, postanowiłam przeprowadzić analogiczną reakcję z estrami zawierającymi pierścień cyklobutanowy i cykloheksanowy w temperaturze wrzenia i bez promieniowania mikrofalowego, co znacznie wydłużyło czas reakcji. Reakcje prowadzone były odpowiednio przez 7 (synteza związku **3j**) i 14 dni (**3i**) (kontrola chromatograficzna TLC: octan etylu). Ze względu na długi czas prowadzenia reakcji i tworzenie się produktów ubocznych, które utrudniały wyodrębnienie interesujących nas produktów, związki **3i** i **3j** wyizolowano z niewielką wydajnością (Schemat 14).



Schemat 14. Synteza pochodnych 2-(alliloamino)tiazol-4(5*H*)-onu zawierających układy spiro.

W podobny sposób otrzymano serię pochodnych 2-(metyloamino)tiazol-4(5*H*)-onu, których synteza i aktywność w kierunku inhibicji 11β-HSD1 opisana została w [*Publikacja P5*] (Tabela 4). Pochodne 2-(metyloamino)tiazol-4(5*H*)-onu zawierające proste i rozgałęzione podstawniki alkilowe w położeniu 5 pierścienia tiazolowego (**4b** – **4f**) otrzymano analogicznie jak ich allilowe analogi. W przypadku 2-bromo-2-aryloestrów, ze względu na to, że reakcja w środowisku zasadowym prowadziła do tworzenia produktów ubocznych, co utrudniało wyodrębnienie związku z mieszaniny poreakcyjnej, zmieniłam warunki jej prowadzenia. Pochodne **4g** i **4h** otrzymałam w reakcji *N*-metylotiomocznika z odpowiednimi 2-bromo-2-aryloestrami w chloroformie, w temperaturze pokojowej. Zmiana warunków prowadzenia reakcji pozwoliła na uzyskanie pochodnych **4g** i **4h** z nieco wyższymi wydajnościami izolowanymi, w porównaniu z ich allilowymi analogami. W celu otrzymania związków spiro **4i** i **4j** zastosowano procedurę opisaną w [*Publikacja P4*].

Tabela 4. Synteza pochodnych 2-(metyloamino)tiazol-4(5*H*)-onu.



L.p.	R ₁	R ₂	Wydajność izolowana (%)	Temp. Topn. (°C)
4b	H	CH ₃	45 ^A	117-118
4c	H	C ₂ H ₅	89 ^A	96-97
4d	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	63 ^A	83-84
4e	H	CH(CH ₃) ₂	86 ^A	93-95
4f	CH ₃	CH ₃	33 ^A	149-151
4g	H	C ₆ H ₅	39 ^B	183-184
4h	H	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	48 ^B	209-210
4i		<i>c</i> -C ₅ H ₁₀	6 ^C	oil
4j		<i>c</i> -C ₃ H ₆ cycl	15 ^C	167-168

^AProcedura A, ^BProcedura B, ^CProcedura C

Aktywność pochodnych 2-aminotiazolo-4(5H)-onu w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej

Ze względu na podobieństwo strukturalne otrzymanych pochodnych 2-aminotiazolo-4(5H)-onu (**3a** – **3j**, **4b** – **4j**) do związków, które okazały się selektywnymi inhibitorami 11 β -HSD1, postanowiłam sprawdzić, czy wykazują one również aktywność w tym kierunku. Wyniki tych badań opublikowane zostały w [**Publikacja P4**, **Publikacja P5**].

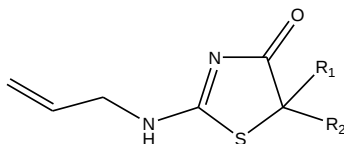
W celu sprawdzenia, czy badane związki hamują aktywność 11 β -HSD1, przeprowadzono reakcję redukcji kortyzonu do kortyzolu w 96-dółkowych płytkach w obecności frakcji mikrosomalnych z wątroby ludzkiej, które były źródłem enzymu, NADPH oraz potencjalnych inhibitorów (związków **3a** – **3j**, **4b** – **4j**), których stężenie wynosiło 10 μ M. W celu zbadania inhibicji 11 β -HSD2 przeprowadzono reakcję odwrotną, stosując frakcje mikrosomalne z nerki ludzkiej jako źródło izoformy 2 enzymu i NAD jako kofaktor. Mieszaniny reakcyjne inkubowano w temperaturze 37 °C przez 150 minut. Ilość kortyzolu powstałego w reakcji 1 oraz nieprzereagowanego kortyzolu, pozostałego po reakcji 2 zmierzono wykorzystując zestaw do ilościowego oznaczenia kortyzolu *Cortisol ELISA kit*. Hamowanie działania dehydrogenazy oznaczano jako % inhibicji przy stężeniu potencjalnego inhibitora 10 μ mol/l.

Jako pierwszą zsyntetyzowano i poddano badaniom serię pochodnych 2-(alliloamino)tiazolo-4(5H)-onu (**3a** – **3j**) [**Publikacja P4**]. Przed przystąpieniem do oznaczeń *in vitro* oszacowano prawdopodobieństwo aktywności analizowanych związków w kierunku inhibicji 11 β -HSD1 za pomocą programu *PASS on line*. *PASS* (Prediction of Activity Spectra for Substances) to oprogramowanie zaprojektowane jako narzędzie do oceny ogólnego potencjału biologicznego organicznej cząsteczki podobnej do leku. Program zapewnia równoczesne przewidywania wielu rodzajów aktywności biologicznej w oparciu o strukturę związków organicznych. W ten sposób można go wykorzystać do oceny profili aktywności biologicznej cząsteczek wirtualnych przed ich syntezą chemiczną i testami biologicznymi (*PASS on line*). Prawdopodobieństwo aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1 oszacowane przez program *PASS on line* (P_a) wahało się w zakresie od 0%, w przypadku pochodnej **3a** nie zawierającej podstawnika w położeniu 5, do 80% dla pochodnych **3i** i **3j** zawierających układy spiro w których atomem centralnym (atomem łącznikowym) jest węgiel C-5 pierścienia tiazolowego (Tabela 5). W przypadku pochodnych

3b – 3d zawierających nierozgałęzione, alifatyczne podstawniki o 1 – 3 atomach węgla, prawdopodobieństwo P_a jest stosunkowo niewielkie (w granicach 26 - 30%). Badania *in vitro* potwierdziły, że związki o takiej strukturze nie wykazują aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Nieco wyższą wartością P_a (46%) charakteryzuje się pochodna **3g** z podstawnikiem fenylowym w położeniu 5. Bardziej obiecujące wydawały się być: pochodna **3e**, zawierająca w położeniu 5 podstawnik izopropylowy ($P_a = 77\%$), związek **3f** z dwiema grupami metylowymi w położeniu 5 ($P_a = 73\%$) oraz związek **3h** zawierający podstawnik *p*-bromofenyłowy w położeniu 5 ($P_a = 68\%$). Niestety, pomimo wysokich wartości P_a związki **3e** i **3f** nie wykazują aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Natomiast związek **3h** w stężeniu 10 μ M w niewielkim stopniu hamuje aktywność dehydrogenazy (13,46%). Związki **3i** i **3j** wykazują najwyższą i jednakową wartość P_a (80%). Pomimo bardzo podobnej struktury, w badaniach *in vitro* obserwuje się znaczną różnicę w aktywności tych pochodnych (71,27% inhibicji przy stężeniu 10 μ M dla związku **3i** i tylko 38,03% dla związku **3j**). Przyczyną może być różnica w oddziaływaniach hydrofobowych pierścienia cyklobutyłowego i cykloheksylowego z NADP⁺.

Związki **3h**, **3i** i **3j**, które hamują aktywność 11 β -HSD1, zostały poddane dodatkowym testom w celu określenia, czy są one selektywnymi inhibitorami tego enzymu. Jedynie związki, które hamują aktywność 11 β -HSD1 i nie hamują aktywności 11 β -HSD2, mogą mieć rzeczywisty wpływ na poziom kortyzolu w organizmie i w konsekwencji mogą być poddawane dalszym badaniom pod kątem ich stosowania jako leków. Badania wykazały, że dla wszystkich trzech analizowanych związków % inhibicji 11 β -HSD2 był niższy niż % inhibicji 11 β -HSD1 przy stężeniu inhibitora 10 μ M i wynosił odpowiednio: 1,34% dla związku **3h**, 23,97% dla związku **3i** i 22,60% dla związku **3j**. Dla porównania, karbenoksolon - znany inhibitor 11 β -HSD1 - wykazuje nieco wyższą aktywność w stężeniu 10 μ M (89,7%), ale ma ograniczone zastosowanie w leczeniu chorób metabolicznych, ponieważ nie jest selektywny dla tego enzymu (*Diederich i wsp., 2000*). Wydaje się więc, że **związek 3i o wysokim stopniu hamowania 11 β -HSD1 i względnie dużej różnicy w hamowaniu aktywności 11 β -HSD1 i 11 β -HSD2 jest obiecujący i powinien być poddany dalszym badaniom.**

Tabela 5. Aktywność pochodnych 2-(alliloamino)thiazolo-4(5*H*)-onu w kierunku inhibicji 11β-HSD.



L.p.	R ₁	R ₂	P _a (%)	% Inhibicji 11β-HSD1 10 μM	IC ₅₀ 11β-HSD1 (μM)	% Inhibicji 11β-HSD2 10 μM	Energia wiązanania 11β-HSD1 kJ/mol ^a	Energia wiązanania 11β-HSD1 kJ/mol ^b
3a	H	H	-	0	n.ozn.	n.ozn.	-18,9 ± 0,7	-20,5 ± 0,8
3b	H	CH ₃	28	0	n.ozn.	n.ozn.	-20,4 ± 0,7 ^c	-22,4 ± 0,5 ^c
3c	H	C ₂ H ₅	30	0	n.ozn.	n.ozn.	-21,6 ± 0,5 ^c	-23,4 ± 0,7 ^c
3d	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	26	0	n.ozn.	n.ozn.	-22,5 ± 0,6 ^c	-24,1 ± 0,8 ^c
3e	H	CH(CH ₃) ₂	77	0	n.ozn.	n.ozn.	-23,6 ± 0,7 ^c	-23,9 ± 0,9 ^c
3f	CH ₃	CH ₃	73	0	n.ozn.	n.ozn.	-21,7 ± 0,5	-23,9 ± 0,5
3g	H	C ₆ H ₅	46	0	n.ozn.	n.ozn.	-28,0 ± 0,6 ^c	-29,7 ± 0,8 ^c
3h	H	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	68	13,46	>50 ^d	1,34	-27,8 ± 1,1 ^c	-29,6 ± 0,8 ^c
3i		<i>c</i>-C₅H₁₀	80	71,27	2,5±0,3^d	23,97	-27,0 ± 0,9	-29,4 ± 1,1
3j		<i>c</i> -C ₃ H ₆	80	38,03	36±1,2 ^d	22,60	-23,8 ± 0,9	-24,1 ± 0,7

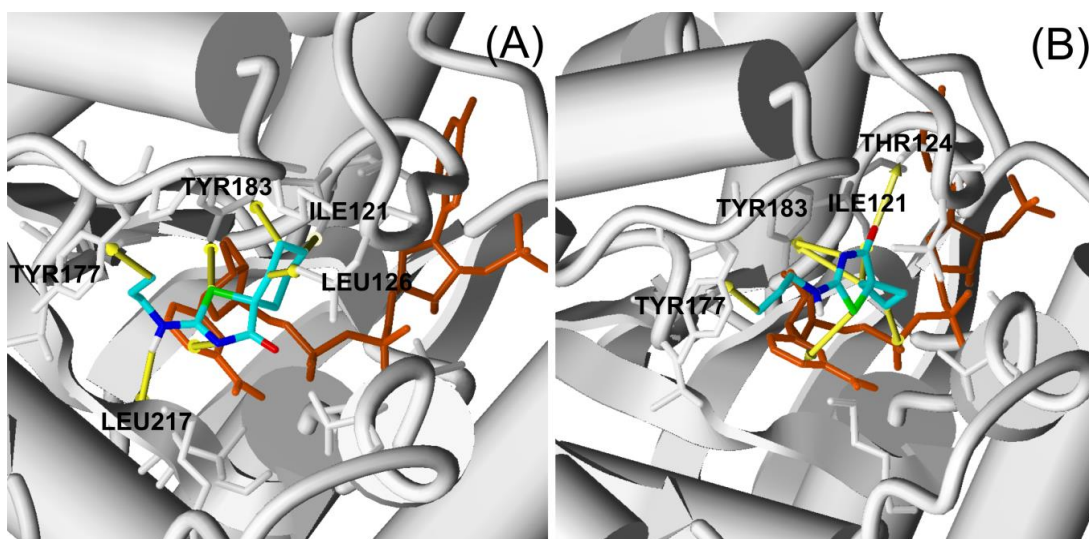
^a bez cząsteczki NADP⁺, ^b z cząsteczką NADP⁺, ^cuśrednione dla dwóch stereoizomerów, ^dwartości wyznaczone przy 5 stężeniach inhibitora w 3 niezależnych oznaczeniach, n.ozn. – nie oznaczono

W celu lepszego zrozumienia oddziaływań pomiędzy analizowanymi cząsteczkami a 11β-HSD1 przeprowadzono modelowanie molekularne, które wykazało, że cząsteczki inhibitora oddziałują zarówno z NADP⁺, jak i łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych enzymu. Korzystne usytuowanie dwóch najsilniejszych inhibitorów (**3i** i **3j**) oraz związane z nimi oddziaływania ligand-białko i ligand-NADP⁺ pokazano na Rysunku 2. Większość z nich jest wspólna dla wszystkich badanych związków. Najistotniejsze z nich to: (1) oddziaływania π-π pomiędzy grupą allilową inhibitora a aromatycznym pierścieniem Tyr177; (2) oddziaływanie pierścienia thiazolowego z Tyr183; (3) wiązanie wodorowe pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej inhibitora i Thr124; (4) oddziaływania niepolarnych grup inhibitora z Ile121; (5) kontakt polarnej części cząsteczki inhibitora z pierścieniem pirydynowym lub grupą amidową NADP⁺.

Dla wszystkich analizowanych związków obserwuje się oddziaływania ligand-NADP⁺. Jednak jak pokazuje wynik dokowania przeprowadzonego bez udziału NADP⁺, ten

typ interakcji ma niewielki wpływ na całkowitą trwałość wiązań ligand-białko. Wynika to prawdopodobnie ze sposobu oddziaływania ligand-NADP⁺, obejmującego tylko tę część struktury ligandu, która jest wspólna dla wszystkich inhibitorów (tzn. pierścienia tiazolowego i grupy aminowej). W związku z tym różnice w obliczonych wartościach energii wiązania są spowodowane głównie różnicami w strukturze podstawników w położeniu 5 pierścienia tiazolu. Ligandy z niewielkimi podstawnikami (**3a** - **3f**) wykazują zauważalnie niższe energie wiązania niż pozostałe (**3g** - **3j**).

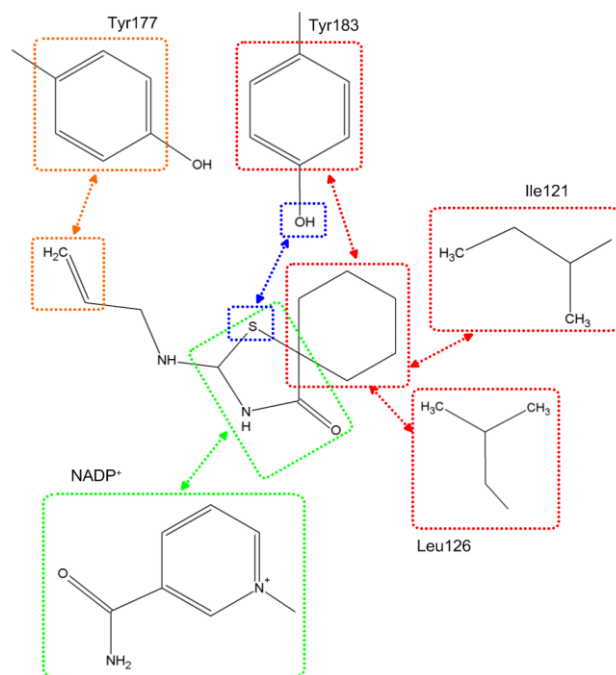
Analizując dane uzyskane przez modelowanie molekularne w porównaniu z danymi eksperymentalnymi zauważyć można, że trzy z czterech najwyższych energii wiążących (-24,1 – -29,7 kJ/mol) wykazują związki **3h** - **3j**, dla których została udowodniona eksperymentalnie aktywność w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Związek **3g**, zawierający również duży, niepolarny podstawnik charakteryzuje się wysoką energią wiązania ale nie wykazuje aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Dla pozostałych sześciu związków wartości energii wiązania są znacznie niższe. Pokazuje to, że wyniki obliczeń są zgodne z danymi eksperymentalnymi, z wyjątkiem związku **3g**.



Rysunek 2. Struktura kompleksów utworzonych przez 11 β -HSD1 i związki **3i** (A) oraz **3j** (B). Najważniejsze oddziaływania ligand-białko oraz ligand-NADP⁺ zaznaczono kolorem żółtym. Częsteczkę NADP⁺ zaznaczono kolorem pomarańczowym.

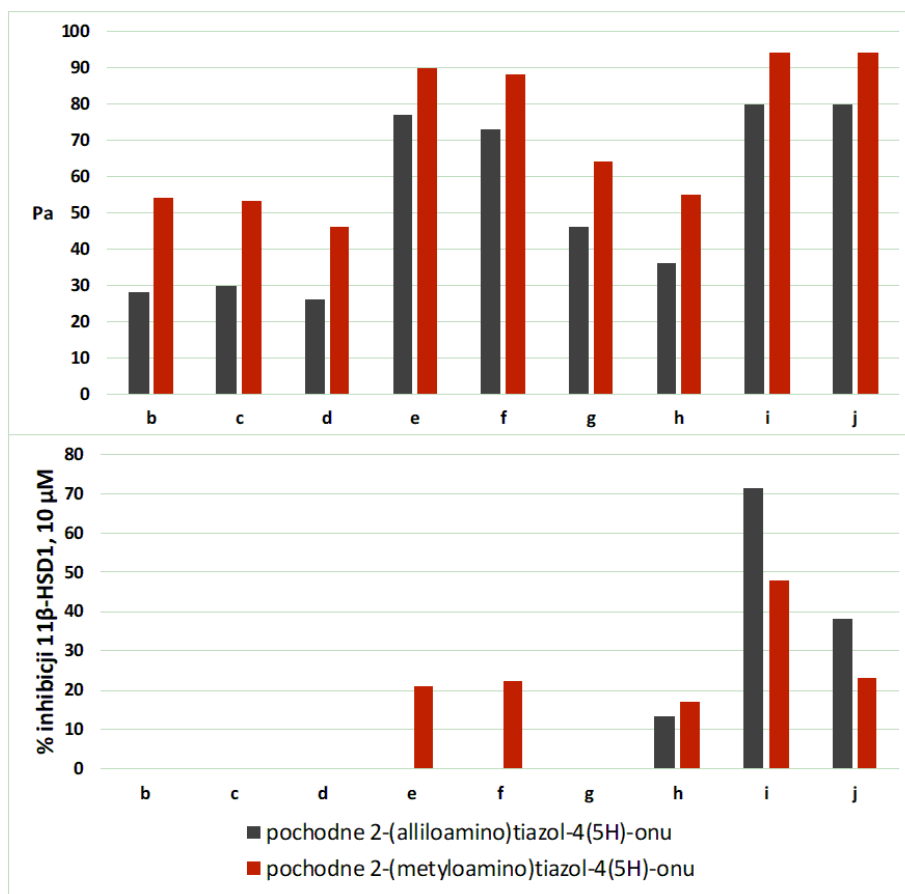
Interesujące jest, że dla najbardziej aktywnego związku (**3i**), wspólny wzorzec oddziaływań ulega nieznacznej zmianie: ze względu na odwrócenie pierścienia tiazolowego nie obserwuje się wiązania wodorowego z Thr124, natomiast pojawiają się silne oddziaływania obejmujące niepolarny pierścień cykloheksanowy i Tyr183, Ile121

oraz **Leu126**. Ogólny wzór oddziaływań między najbardziej aktywnym związkiem (**3i**) a kompleksem NADP⁺/białko przedstawiono na Rysunku 3.



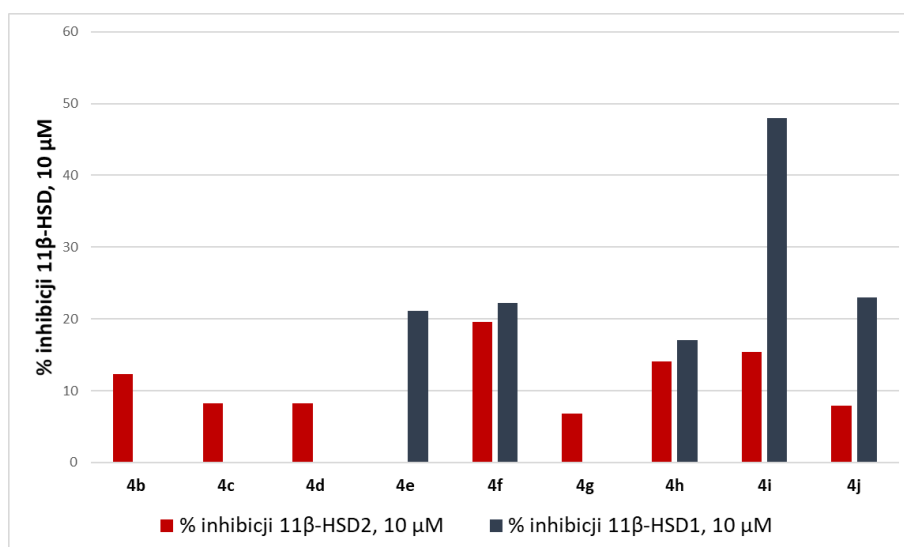
Rysunek 3. Ogólny schemat oddziaływań między związkiem **3i** a kompleksem NADP⁺/białko.

Ze względu na to, że program PASS *on line* szacował wyższe prawdopodobieństwo aktywności dla pochodnych 2-(metyloamino)tiazol-4(5*H*)-onu w porównaniu z ich allilowymi analogami, w kolejnym etapie badaniom poddano serię tych pochodnych [**Publikacja P5**]. Okazało się jednak, że pomimo lepszych rokowań, pochodne metylowe charakteryzują się słabszą aktywnością w kierunku inhibicji 11β-HSD1 (Rysunek 4). Konsekwentnie najbardziej aktywny okazał się związek zawierający układ *spiro* pierścieni dihydrotiazolowego i cykloheksanowego (**4i**), jednak jego aktywność jest znacznie niższa niż jego allilowego analogu (zaledwie 48 % vs. 71 %). Również pochodna **4j**, zawierająca w swojej strukturze układ *spiro* odznacza się niższą aktywnością (23 % vs. 38 %). Odwrotną sytuację obserwuje się w przypadku 5-bromofenylo pochodnych, gdzie metylowa pochodna **4h** wykazuje nieco wyższą aktywność w porównaniu z jej allilowym analogiem (**3h**). Interesujące jest to, że w przypadku metylowych pochodnych zaobserwowano również występowanie aktywności inhibicyjnej (ponad 20% przy stężeniu 10 μM) dla dwóch związków z grupami alkilowymi w położeniu 5: pochodnej **4e**, zawierającej podstawnik izopropylowy oraz pochodnej **4f** z dwiema grupami metylowymi.



Rysunek 4. Porównanie aktywności pochodnych 2-(metyloamino)- i 2-(alliloamino)thiazol-4(5H)-onu w kierunku inhibicji 11 β -HSD1 oraz wartości prawdopodobieństwa aktywności oszacowane przez program PASS *on line*.

Otrzymane pochodne metylowe zbadano również w kierunku inhibicji 11 β -HSD2 (Rysunek 5). Okazuje się, że wszystkie związki z wyjątkiem **4e** wykazują niewielką aktywność. Najsilniejszym inhibitorem tego enzymu (19.52% przy stężeniu 10 μ M) jest związek **4f**. Na uwagę zasługuje związek **4e**, wykazujący się brakiem inhibicji 11 β -HSD2. Jest to pierwszy z badanych przez nas związków, który odznacza się brakiem aktywności w tym kierunku. Mimo stosunkowo niskiego stopnia inhibicji izoformy 1 enzymu, mógłby być brany pod uwagę jako związek wyjściowy do dalszego poszukiwania selektywnych inhibitorów 11 β -HSD1, które charakteryzują się całkowitym brakiem inhibicji izoformy 2.



Rysunek 5. Aktywność pochodnych 2-(metyloamino)tiazol-4(5*H*)-onu w kierunku inhibicji 11β-HSD1 oraz 11β-HSD2.

Różnice w wynikach badań *in vitro* dla allilowych i metylowych pochodnych skłoniły mnie do podjęcia próby ich wyjaśnienia, za pomocą modelowania molekularnego. Analiza pokazała, że w przypadku metylowych pochodnych najczęstsze oddziaływania obejmują następujące reszty aminokwasowe: Ile121, Thr124, Leu126, Ser170, Tyr177, Tyr183, Leu217 i Thr222. Dla każdej z tych reszt zaobserwowano co najmniej jeden bezpośredni kontakt ligand-białko. Jednak szczegółowe oddziaływania zależą od typu ligandu. Najczęściej powtarzającymi się resztami są Leu217, Tyr177, Tyr183 i Ser170. Oprócz nich cząsteczki ligandu często utrzymują bezpośredni kontakt z cząsteczką NADP⁺. Zatem wyniki te są jakościowo zgodne z tymi dotyczącymi pochodnych allilowych.

Jednak zastąpienie ugrupowania allilowego grupą metylową może prowadzić do kilku istotnych przegrupowań. Najbardziej znaczące zmiany są widoczne w przypadku związków **4e**, **4i** i **4j**. W tych przypadkach obserwuje się obrót całej cząsteczki w taki sposób, że regiony alifatyczne cząsteczki ligandu pozostają w kontakcie zarówno z Tyr177, jak i Ser170. W tym samym czasie zarówno pierścień tiazolowy, jak i ugrupowanie metyloaminowe oddziałują z Leu217. Co ciekawe, pozostałe metylowe pochodne (tj. **4f** i **4h**) nie wykazują żadnych znaczących zmian we wzorach interakcji białko-ligand w porównaniu z pochodnymi allilowymi, z wyjątkiem translacji całości struktury w kierunku Tyr177. Zróżnicowane zachowanie obserwowane dla związków **4e**, **4i** i **4j** można wyjaśnić brakiem stabilizujących oddziaływań między ugrupowaniem allilowym ligandów i Tyr177, które obserwowano w przypadku pochodnych allilowych. Oddziaływania te są naśladowane przez kontakt największego niepolarnego ugrupowania analizowanych związków

(pierścieni alifatycznych w przypadku związków **4i** i **4j** lub ugrupowania izopropylowego związku **4e**) z tymi samymi resztami aminokwasowymi. Mniejsza cząsteczka związku **4f** wykazuje zachowanie podobne do jej allilowego analogu strukturalnego, co prawdopodobnie wynika z braku reszt niepolarnych wystarczająco dużych, aby utworzyć stabilne interakcje z wyżej wymienionymi resztami. Natomiast związek **4h** wykazuje silne oddziaływanie jego pierścienia fenyłowego z Thr124 i Ile121, które zapobiegają obrotowi całej struktury w jamie wiążącej.

Podsumowując wyniki obserwowane dla allilowych i metylowych pochodnych, wydaje się, że kluczowymi oddziaływaniami, które określają orientację związku w jamie wiążącej, są interakcje π - π między ugrupowaniem allilowym liganda i pierścieniem aromatycznym Tyr177. Gdy są one nieobecne lub ligand nie jest zdolny do tworzenia innych oddziaływań stabilizujących (np. obejmujących dodatkowy pierścień aromatyczny, jak to ma miejsce w przypadku związku **4h), brak ugrupowania allilowego jest kompensowany przez bliższy kontakt niepolarnych regionów cząsteczki liganda z Tyr177 i reorientację całej cząsteczki w jamie wiążącej. Zauważyć jednak należy, że oddziaływania między grupą allilową liganda i pierścieniem aromatycznym Tyr177 nie gwarantują aktywności cząsteczki. Aby cząsteczka wykazywała aktywność inhibicyjną konieczna jest obecność dodatkowych oddziaływań, które stabilizują cząsteczkę w centrum aktywnym.**

Chociaż nie wszystkie analizowane dotąd pochodne 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu wykazywały aktywność w kierunku inhibicji 11 β -HSD1, to obiecujące wyniki dla związku **3i** są podstawą do kontynuacji badań nad tą grupą związków. **Wnioski wynikające z porównania wyników *in vitro* dla dwóch serii pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu różniących się podstawnikami w grupie aminowej z danymi dokowania molekularnego pozwalają na bardziej precyzyjne zaplanowanie struktury kolejnych serii pochodnych tak, aby zwiększyć prawdopodobieństwo ich aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1.**

*Aktywność pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej*

Wcześniej nie prowadzono badań i nie opisywano w literaturze możliwości zastosowania pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu jako inhibitorów 11 β -HSD1. Jednak ze względu na obecność w ich strukturze atomów i ugrupowań, które w przypadku pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu oddziaływały z 11 β -HSD1 oraz NADP⁺, poddano badaniu 29 pochodnych zawierających skondensowane pierścienie pirymidynowy i tiazolowy. Wyniki zostały opublikowane w [**Publikacja P6**]. Było to 12 pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**1 – 12**), 6 pochodnych 2-bromometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**13 – 18**) oraz 11 pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu (**19 – 29**). Związki te różniły się podstawnikami w pierścieniu pirymidynowym.

W celu sprawdzenia, czy hamują one aktywność dehydrogenazy, oznaczono % inhibicji 11 β -HSD1 zawartej we frakcjach mikrosomalnych z wątroby ludzkiej, za pomocą wszystkich analizowanych związków przy stężeniu inhibitora 10 μ M (Tabela 6). Związki **1, 4 - 7, 9, 16, 17, 19** nie wykazują jakiegokolwiek aktywności w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Pozostałe pochodne w stężeniu 10 μ M hamują działanie 11 β -HSD1 w zakresie od 2,94 do 59,15%. **Najwyższą aktywnością (59,15%) wykazał się 7-cykloheksylometylo-2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on (12), który jako jedyny z 2-jodometylo pochodnych zawiera duże ugrupowanie alkilowe (grupę cykloheksylometylową).** Spośród 2-bromometylo pochodnych najwyższą aktywność wykazuje związek **15**, zawierający grupy metylowe w położeniu 6 i 7. Dla porównania analogiczna 2-jodometylo pochodna (**7**) nie wykazuje działania hamującego w stosunku do 11 β -HSD1. Przyczyną może być tworzenie słabszych wiązań wodorowych między atomem jodu a fragmentami seryny i tyrozyny w 11 β -HSD1. Atom bromu ma wyższą wartość elektroujemności, przez co w przypadku 2-bromometylo pochodnej **15** tworzą się silniejsze wiązania wodorowe. W przypadku pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu najbardziej aktywny okazał się związek **25**, zawierający grupy metylowe w położeniu 6 i 7 (30,59%) oraz niepodstawiony 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on **24** (29,41%).

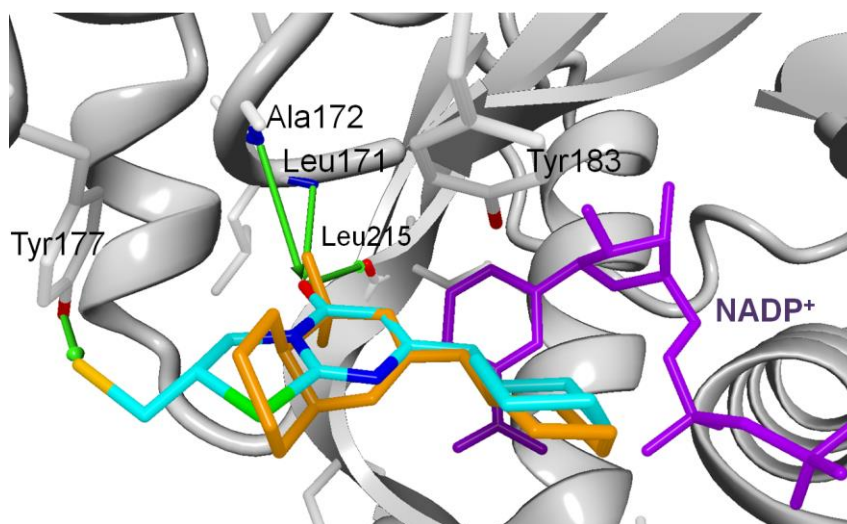
Tabela 6. Struktura, prawdopodobieństwo aktywności, % inhibicji 11 β -HSD1 oraz wartości Docking Score pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu **1** - **12**, 2-bromometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu **13** - **18** i 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu **19** - **29**.

L.p.	Wzór	R ¹	R ²	P _A ¹ [%]	% Inhibicji 11 β -HSD1 10 μ M	Docking Score [kJ/mol] ²
1		-(CH ₂) ₃ -		8,8 ³	0	-312,3
2		-(CH ₂) ₄ -		8,8 ³	27,94	-411,6
3		-(CH ₂) ₅ -		8,8 ³	23,53	-425,1
4		H	CH ₃	-	0	-351,9
5		NO ₂	CH ₃	-	0	-334,7
6		H	H	-	0	-328,2
7		CH ₃	CH ₃	-	0	-329,6
8		CH ₃	H	-	13,24	-361,7
9		Br	CH ₃	-	0	-340,3
10		H	C ₂ H ₅	-	20,59	-399,1
11		Br	H	-	32,35	-471,4
12		H	CH₂C-C₆H₁₁	-	59,15	-518,5
13		H	CH ₃	-	2,94	-351,7
14		NO ₂	CH ₃	-	32,35	-411,6
15		CH ₃	CH ₃	-	33,82	-460,4
16		CH ₃	H	-	0	-323,4
17		Br	CH ₃	-	0	-333,0
18		Br	H	-	25,00	-368,7
19		-(CH ₂) ₃ -		11,8 ³	0	-313,4
20		-(CH ₂) ₄ -		11,8 ³	13,24	-326
21		-(CH ₂) ₅ -		11,8 ³	14,71	-315,7
22		H	CH ₃	7,2 ³	17,65	-362,4
23		NO ₂	CH ₃	-	20,59	-399,9
24		H	H	33,2 ⁴ 14,7 ⁵	29,41	-432,3
25		CH ₃	CH ₃	-	30,88	-446,8
26		CH ₃	H	8,4 ³	20,59	-387,9
27		Br	CH ₃	-	2,94	-347,4
28		H	C ₂ H ₅	-	23,53	-438,9
29		H	CH ₂ C-C ₆ H ₁₁	7,7 ³	27,94	-501,6
30	karbenoksolon				89,70	-566,3

¹P_A – prawdopodobieństwo aktywności farmakologicznej oszacowane przez program PASS on line, ²leczenie zespołu Cushinga, ³Leczenie zespołu metabolicznego, ⁴Inhibitor dehydrogenazy hydroksysteroidowej

W celu wykazania molekularnego mechanizmu oddziaływań pomiędzy testowanymi związkami a 11 β -HSD1 przeprowadzono symulacje dokowania. Modelowanie molekularne wykazało, że najważniejsze oddziaływania pomiędzy pochodnymi tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu a 11 β -HSD1 obejmują wiązania wodorowe utworzone pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej ligandu i Ala172, Leu171 i Leu215. Ponadto testowane ligandy wykazują hydrofobowe kontakty z NADP⁺ oraz oddziaływania π - π z Tyr177. Atomy jodu i bromu obecne w cząsteczce mogą również tworzyć wiązania wodorowe z Tyr177. Ponadto, ugrupowanie tiazolowe liganda może tworzyć oddziaływania π - π z pierścieniem aromatycznym Tyr177. W przypadku związków zawierających grupę nitrową (**14**, **23**) obserwuje się bliższy kontakt grupy karbonylowej z Tyr183 i Ser170 i jednocześnie tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomami tlenu grupy nitrowej i Ala172, Leu171 oraz Leu215. Podstawienie pozycji R₁ i R₂ przez ugrupowania alkilowe lub cykloalkanowe (**2**, **3**, **12**) prowadzi do powstania hydrofobowych kontaktów z NADP⁺.

Najbardziej aktywny związek **12** wiąże się z wnęką wytworzoną przez Ala172, Leu171, Leu215, Gly216, Ser170, Tyr183 i Tyr177, podobnie jak cząsteczka inhibitora współkryształizowanego z 11 β -HSD1 (pochodna *cis*-1,1-dioksa-5,6-dihydro-[4,1,2]oksatiazyny). Ponadto, ugrupowanie cykloalkanowe w pozycji R₂ może tworzyć hydrofobowe kontakty z NADP⁺ (Rysunek 6).

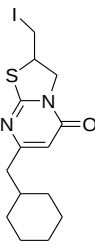


Rysunek 6. Oddziaływanie 11 β -HSD1-związek **12**. W związku **12** pierwiastki oznaczone są kolorami (węgiel – niebieski, tlen – czerwony, siarka – zielony, azot – granatowy, jod – żółty). Ligand tworzy wiązania wodorowe (zielone strzałki) z Ala172, Leu171, Leu215 i Tyr177. Kolorem fioletowym zaznaczona jest cząsteczka NADP⁺, pomarańczowym cząsteczka inhibitora, która była współkryształizowana z 11 β -HSD1 (PDB: 4K1L).

Jakość dokowania oceniona została na podstawie wartości funkcji oceniającej dokowanie, tj. Docking Score [kJ/mol]. **Najniższą (tj. najkorzystniejszą) wartość Docking Score uzyskano dla najbardziej aktywnego związku 12 (-518,5 kJ / mol). Jest to wartość zbliżona do wartości uzyskanej dla karbenoksolonu, znanego inhibitora 11 β -HSD1. Dla pozostałych testowanych związków wartości te były mniej korzystne (Tabela 6), co jest zgodne z eksperymentalnie określonym procentem inhibicji.**

Dla najbardziej aktywnego związku **12** określono IC₅₀, (stężenie związku **12** powodujące inhibicję aktywności 11 β -HSD1 w 50% - 6,90 μ M) oraz procent hamowania drugiej izoformy enzymu - 11 β -HSD2 przy stężeniu 10 μ M (4,74%) – Tabela 7. Wartości te pokazują, że **w warunkach analizy *in vitro* związek 12 hamuje aktywność 11 β -HSD1 w dużym stopniu i jedynie w niewielkim stopniu aktywność 11 β -HSD2. Można zatem powiedzieć, że jest to selektywny inhibitor dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1 i w konsekwencji może mieć rzeczywisty wpływ na regulację poziomu kortyzolu w organizmie.**

Tabela 7. Zestawienie wartości wpływających na selektywność inhibicji związku **12**.

	% inhibicji 11 β -HSD1	
	10 μ M	59,15
	IC ₅₀ [μ M]	6,9 $\pm$ 1,2
	% inhibicji 11 β -HSD2	
	10 μ M	4,74

Przedstawione wyniki pokazują, że wiele z badanych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu wykazuje aktywność w kierunku inhibicji 11 β -HSD1. Pomimo, iż nie jest ona tak wysoka jak w przypadku karbenoksolonu (89,7%), to poszukując skutecznych inhibitorów warto zwrócić uwagę na grupę pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Zwłaszcza, że modyfikując podstawniki zarówno w pierścieniu tiazolowym jak i pirymidynowym możliwe jest zwiększenie aktywności związków. Na przykład wprowadzenie podstawników jodometylowych lub bromometylowych do grupy tiazolowej prowadzi do utworzenia wiązania wodorowego z Tyr177. Co więcej, podstawienie pozycji R₁ i R₂ resztami alkilowymi lub cykloalkanowymi (związki **2**, **3**, **12**) umożliwia tworzenie

hydrofobowych kontaktów z NADP^+ , co również wpływa na zwiększenie aktywności związków.

Wnioski końcowe

Nieselektywne działanie karbenoksolonu, znanego inhibitora 11β -HSD1 wpływa na ograniczony zakres jego zastosowania klinicznego, co skłania do poszukiwania nowych selektywnych inhibitorów 11β -HSD1, które mogłyby być stosowane w leczeniu zespołu Cushinga, zespołu metabolicznego oraz cukrzycy typu 2.

Poszukiwanie selektywnych inhibitorów w grupie pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu oraz pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, przedstawione w niniejszym osiągnięciu naukowym pokazuje, że zarówno jedna jak i druga grupa związków dają pole do kontynuowania badań w tym zakresie. Najbardziej aktywna pochodna zawierająca układ tiazolopirymidynowy, chociaż nie wykazuje tak dużej aktywności jak karbenoksolon, jest bardziej selektywnym inhibitorem 11β -HSD1. Dlatego warto kontynuować badania nad tą grupą związków, ponieważ poprzez modyfikację podstawników możliwe jest osiągnięcie jeszcze lepszych wyników. W przypadku pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu również modyfikacja podstawników, zarówno w grupie aminowej w położeniu 2, jak i w położeniu 5 pierścienia tiazolowego, może powodować wzrost oddziaływań hydrofobowych z 11β -HSD1 oraz NADP^+ , a tym samym wzrost aktywności związków.

Przedstawiony cykl publikacji dostarcza również istotnej wiedzy na temat syntezy nowych pochodnych heterocyklicznych:

- zawierających skondensowane pierścienie: pirymidynowy i tiazolowy, zarówno poprzez zamykanie pierścienia tiazolowego w pochodnych pirymidyny, jak i modyfikacji pierścienia pirymidynowego w reakcjach substytucji elektrofilowej,
- *N*-podstawionych pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu w reakcji kondensacji *N*-allilotiomocznika z 2-halogenoestrami zawierającymi różne podstawniki alifatyczne i aromatyczne.

4.3.4. Perspektywy badawcze związane z osiągnięciem naukowym

Planowane jest kontynuowanie tematyki badawczej przedstawionej w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe. Aktualnie trwają badania nad syntezą nowych serii pochodnych 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu podstawionych różnymi podstawnikami alkilowymi

w grupie aminowej. Związki te będą badane w kierunku inhibicji dehydrogenazy 11β -hydroksysteroidowej, w celu dalszych poszukiwań selektywnego inhibitora izoformy 1 enzymu. W kolejnym etapie planuję zająć się syntezą nowych, zmodyfikowanych pochodnych tiazolopirymidyn, które wykazywałyby jeszcze wyższą aktywność w kierunku inhibicji 11β -HSD1 i były jeszcze bardziej selektywne niż związek 12.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Oprócz przedstawionego powyżej cyklu 6 publikacji, wybranych, jako podstawa do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, w skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi także 28 innych publikacji naukowych, w tym: 13 prac oryginalnych, 15 artykułów popularnonaukowych, współautorstwo rozdziału w podręczniku oraz 1 skryptu dla studentów. Sumaryczny *Impact Factor* tych publikacji wynosi **25.483 (397 punktów MNiSW)**, w tym IF 3.622 jako pierwszy autor prac i autor korespondencyjny.

5.1. Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy na kierunku Technologia Chemiczna. Studia ukończyłam w 1997 roku uzyskując tytuł magistra inżyniera w zakresie specjalności Technologia Chemiczna. Pracę magisterską pt. „Badanie właściwości fizykomechanicznych mieszanin różnych typów polietylenu” wykonałam w Katedrze Chemii i Technologii Polimerów pod kierunkiem dr Kazimierza Piszczka (obecnie prof. dr hab. Kazimierz Piszczek).

W pracy magisterskiej prowadziłam badania mające na celu ocenę współmieszalności dwóch typów polietylenu: niskociśnieniowego GC 7260 i wysokociśnieniowego PFS 4020 przy różnych składach mieszanin. W tym celu próbki przygotowanych wcześniej mieszanin w postaci cienkich błonek poddałam obserwacjom mikroskopowym stosując mikroskop polaryzacyjny i interferencyjny. Ze względu na to, że oba typy polietylenu tworzą w wyniku krystalizacji różne struktury (różne typy sferolitów) możliwa była ocena ich mieszalności. Zaobserwowano efekt wzajemnego zakłócania krystalizacji jednego ze składników przez drugi, natomiast nie stwierdzono obecności struktur, które można by przypisać jednorodnej mieszaninie. Zbadano również właściwości fizykomechaniczne analizowanych mieszanin

tj. wytrzymałość podczas zrywania, wydłużenie względne przy zerwaniu, twardość oraz odporność cieplną metodą Vicata. Badania te wykazały, że najkorzystniejsze właściwości fizykochemiczne wykazuje mieszanina o składzie 10% GC 7260 i 90% PFS 4020.

Po ukończeniu studiów podjęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu) na etacie asystenta.

Pracę doktorską wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Damińskiego. Tematyka badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczyła syntezy nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Głównym jej celem było otrzymanie nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, które mogłyby stanowić materiał wyjściowy do badań biologicznych. Reakcje prowadziłam w 3 etapach.

Etap 1 polegał na otrzymaniu serii pochodnych 3*N*-allylo-2-tiouracylu podstawionych w położeniu 5, i (lub) 6 różnymi grupami alkilowymi, w reakcji kondensacji odpowiednich β-oksoestrów z *N*-allylotiomocznikiem. W zależności od użytego oksoestru, reakcje były prowadzone w środowisku alkalicznym w obecności etanolanu sodu (synteza 6-podstawionych pochodnych 3*N*-allylo-2-tiouracylu) lub kwaśnym (synteza 5-podstawionych oraz 5,6-dipodstawionych pochodnych). W przypadku prowadzenia reakcji w środowisku kwaśnym odpowiedni β-oksoester przeprowadzałam wcześniej w acetal.

Drugi etap to otrzymywanie serii pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu w reakcji zamykania pierścienia tiazolowego w pochodnych 3*N*-allylo-2-tiouracylu. Początkowo reakcje tworzenia pierścienia tiazolowego prowadziłam z metanolem w roztworze jodu. Pierwsze próby pokazały jednak, że czas w którym następuje odbarwienie mieszaniny reakcyjnej jest dość długi (ok. 7 godzin). Analizując mechanizm zamykania pierścienia tiazolowego uznałam, że ponieważ do utworzenia jonu 2',3'-jodoniowego potrzebny jest jon I⁺ uzasadnione jest użycie do reakcji związku, z którego łatwiej ten jon uzyskać. Dlatego postanowiłam jako czynnika powodującego zamknięcie pierścienia tiazolowego użyć chlorku jodu, ze względu na większą polaryzację tej cząsteczki, a tym samym łatwiejsze tworzenie stanu przejściowego. Reakcję prowadziłam w bezwodnym metanolu, ponieważ w tych warunkach (rozpuszczalnik protonowy) bardziej prawdopodobny był atak nukleofilowego atomu siarki cząsteczki *N*-allylotiouracylu (w porównaniu z atakiem jonu Cl⁻) na powstały w pierwszym etapie reakcji karbokation. Przypuszczenia dotyczące przebiegu reakcji potwierdziły się. Reakcja z chlorkiem jodu w bezwodnym metanolu w temperaturze wrzenia zachodziła bezpośrednio po zmieszaniu

substratów (po dodaniu kolejnych porcji ICl następowało natychmiast odbarwienie mieszaniny reakcyjnej, co potwierdzałoby, że kation jodoniowy tworzy się bardzo szybko). Reakcje zamykania pierścienia tiazolowego tą metodą prowadziłam dla 9 różnych pochodnych 3*N*-allilo-2-tiouracylu, otrzymując pochodne 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu z wydajnością 6 – 41,5%.

Etap III polegał na otrzymywaniu pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu w reakcji eliminacji HI z odpowiednich pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu. Opisana wcześniej w literaturze reakcja tego typu prowadzona była w środowisku zasadowym w obecności 1-(*N*-benzylo)piperazyny i K₂CO₃ w temperaturze wrzenia, jednak jej produktem był związek z egzocyklicznym wiązaniem podwójnym, który następnie, w celu otrzymania pochodnej tiazolo[3,2-*a*]pirymidyny poddawano izomeryzacji w obecności stężonego kwasu siarkowego. Poszukując wygodniejszego sposobu eliminacji HI z otrzymanych pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, podjęłam próby przeprowadzenia reakcji w obecności NaOH. Pierwsze doświadczenia, polegające na obserwacji zmiany widma UV w czasie przebiegu reakcji przy użyciu spektrofotometru pokazały, że eliminacja nie zachodzi w obecności stechiometrycznej ilości NaOH. Reakcja eliminacji możliwa była dopiero po dodaniu 10-krotnego nadmiaru NaOH, natomiast dalszy wzrost stężenia zasady nie wpływał na przebieg reakcji. Reakcje eliminacji jodowodoru w obecności 10-krotnego nadmiaru NaOH przeprowadziłam dla 9 różnych pochodnych 2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu, otrzymując pochodne 2-metylotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu z wydajnością 27-51%.

W kolejnym etapie pracy zbadalam postęp reakcji eliminacji HI, poprzez pomiary zmian absorbancji w czasie przebiegu reakcji. Na podstawie tych danych wyznaczyłam rząd reakcji, co umożliwiło postawienie hipotezy dotyczącej mechanizmu reakcji eliminacji. Rząd reakcji wyznaczyłam metoda graficzną. Dla wszystkich badanych reakcji eliminacji zaobserwowałam liniową zależność $f(t) = \log c_s$, co oznacza, że badana reakcja jest reakcją I rzędu. Doświadczalne wyznaczenie rzędowości reakcji potwierdziło wstępne przypuszczenia wysunięte na podstawie faktu, że jeden z substratów występuje w dużym nadmiarze (większość tego typu reakcji jest I rzędu). Na podstawie pomiarów kinetycznych podjęłam próbę ustalenia mechanizmu reakcji. Doświadczalne wyznaczenie rzędu reakcji oraz ustalenie, że jedynym jej produktem jest związek z endocyklicznym wiązaniem podwójnym pozwala przypuszczać, że przebiega ona według mechanizmu *E1* (tego typu reakcje będą według kinetyki I rzędu). W takim przypadku w pierwszym etapie reakcji

następuje jonizacja cząsteczki i utworzenie I-rzędowego karbokationu. Karbokation ten ulega przegrupowaniu do bardziej trwałego produktu pośredniego (ładunek dodatni na III-rzędowym atomie węgla C-2). Drugi etap reakcji polega na oderwaniu protonu przez zasadę i utworzeniu endocyklicznego wiązania podwójnego.

Wszystkie otrzymane w czasie badań produkty zostały zidentyfikowane metodami spektroskopowymi (^1H NMR, MS), których wyniki zostały szczegółowo przedyskutowane w pracy.

Wyniki uzyskane w ramach prowadzenia badań związanych z moją pracą dokorską zostały opublikowane w [*Załącznik numer 3, II.A.a.1*] oraz prezentowane na konferencjach naukowych [*Załącznik numer 3, III.B.2, 4, 6, 9, 16*].

Pracę dokorską pt. „Otrzymywanie nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu” obroniłam w styczniu 2005 roku.

5.2. Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam prace badawcze nad syntezą nowych układów heterocyklicznych, głównie pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-onu oraz 2-aminotiazol-4(5*H*)-onu, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego opisanego w poprzednim rozdziale.

Prowadziłam również badania nad syntezą pochodnych 1*N*-aliloksymetylopirymidyny, które w dalszym etapie wykorzystywane były w projekcie dr Elżbiety Miszczak-Zaborskiej z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi do badań w kierunku inhibicji fosforylasy urydynowej i tymidynowej w nowotworach ludzkich. Synteza tych związków prowadzona była poprzez silylowanie 2,4-dihydroksypirymidyn, a następnie wprowadzenie grupy aliloksymetylowej w położenie N-1 za pomocą eteru allilochlorometylowego [*Załącznik numer 3, II.C.a.2.; III.B.10; III.B.11.*].

Równolegle do prowadzonych badań eksperymentalnych wchodzących w zakres moich głównych tematów naukowych, od kilku lat uczestniczę również innych projektach badawczych. Moje zainteresowania badawcze, oprócz tematyki ujętej w pracach składających się na osiągnięcie naukowe, skupiają się głównie na następujących zagadnieniach:

1) Enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja związków prochiralnych

Enancjoselektywne reakcje desymetryzacji są istotne z punktu widzenia syntezy związków optycznie czynnych, z których wiele wykazuje aktywność biologiczną. Jeden z enancjomerów może być biologicznie czynny, podczas gdy drugi jest nieaktywny lub wykazuje niepożądaną aktywność farmakologiczną. Znanym przykładem jest Talidomid, który w latach 60. stosowany był w postaci racemicznej i podawany kobietom ciężarnym. Stereoizomer *R* posiada działanie uspokajające, natomiast enancjomer o konfiguracji *S* ma działanie teratogenne i wywoływał deformacje płodu. Z tego względu synteza enancjomerycznie czystych związków chiralnych jest jednym z ważniejszych wyzwań chemii organicznej. Jedną z metod umożliwiających otrzymanie chiralnych związków o wysokiej czystości optycznej jest enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja (EED). Polega ona na generowaniu asymetrii poprzez przekształcenie cząsteczki achiralnej w związek czynny optycznie w obecności katalizatora enzymatycznego. Przykładem katalizatorów enzymatycznych stosowanych w tego typu syntezach są lipazy.

W tym projekcie badań głównym celem było uzyskanie czystych optycznie chiralnych acyklonukleozydów pirymidynowych w enzymatycznej reakcji desymetryzacji katalizowanej lipazami i dehydrogenazami. W celu przeprowadzenia skutecznej desymetryzacji prochiralnych 1,3-dioli przetestowano kilka handlowo dostępnych lipaz: lipazę B z *Candida antarctica* (CALB), lipazę Amano PS z *Burkholderia cepacia* (BCL), lipazę z *Pseudomonas cepacia* (PCL), lipazę z *Candida rugosa* (OF). Reakcji transestryfikacji poddane zostały diole: 1-([(1,3-dihydroksypropano-2-yl)oksy]metylo)-5-metylopirymidyno-2,4(1*H*,3*H*)-dion, 1-([(1,3-dihydroksypropan-2-yl)oksy]metylo)-5,6,7,8-tetrahydrochinazolino-2,4(1*H*,3*H*)-dion oraz jego alkilowe pochodne. Jako czynnik acylujący zastosowano octan winylu, powszechnie stosowany donor acylu. W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymano monoestry dioli o wysokiej czystości enancjomerycznej (do 99% ee). Spośród przetestowanych lipaz najlepszą enancjoselektywność uzyskano dla bakteryjnej lipazy Amano Ps z *Burkholderia cepacia*. W obecności BCL, zarówno wydajność monoacetylowych pochodnych, jak również czystość enancjomeryczna była najwyższa [Załącznik numer 3, II.A.a.5]

Poza standardowo stosowanymi w tego typu reakcjach rozpuszczalnikami badano również wpływ obecności cieczy jonowych jako medium reakcji na selektywność reakcji acylowania. Najwyższy nadmiar enancjomeryczny (93% ee), wyższy niż w samym rozpuszczalniku organicznym – eterze *tert*-butyloowo-metylowym (TBME), uzyskano w

układzie dwufazowym heksafluorofosforanie 1-butylo-3-metyloimidazoliowym ([BMIM]PF₆) i TBME zmieszanym w stosunku 1:1 (v/v) [Załącznik numer 3, II.A.a.11].

Prowadzone były również reakcje deacylowania diestrów dioli zawierających asymetryczny atom węgla w pierścieniu tetrahydrochinazoliny w obecności lipazy BCL. W przypadku tych substratów stereopreferencja BCL była całkowicie zależna od konfiguracji atomu węgla. Hydroliza racemicznej mieszaniny diacylowych pochodnych przebiegała, niezależnie od medium reakcji, z umiarkowaną selektywnością. BCL hydrolizowała prochiralne grupy acylowe diestru enancjoselektywnie tylko wtedy, gdy wyjściowy substrat miał konfigurację *R*. W przypadku (*S*)-izomeru lipaza nie wykazywała jednoznacznej preferencji w stosunku do określonej prochiralnej grupy estrowej [Załącznik numer 3, II.A.a.3].

W ramach projektu prowadzono również reakcje mikrobiologicznej bioredukcji prochiralnych związków karbonylowych. Prowadzone były biotransformacje 3*N*-fenancylowych 1*N*-podstawionych pochodnych tyminy w reakcji redukcji katalizowanej *Aureobasidium pullulans* w postaci preparatu przeciwgrzybiczego Boni Protect [Załącznik numer 3, II.A.a.9]. Niezależnie od zastosowanego medium reakcji, mikrobiologiczna bioredukcja katalizowana *A. pullulans* przebiegała całkowicie selektywnie. Prochiralne ketony były redukowane z 94-99% nadmiarem enancjomerycznym. Zastosowanie Boni Protect pozwoliło również na otrzymanie enancjomerycznie czystego kwasu 2-(antraceno-9-ylo)-2-metoksyoctowego (9-AMA), który jest stosowany, jako czynnik derywatyzujący w określaniu konfiguracji absolutnej chiralnych związków organicznych za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [Załącznik numer 3, II.A.a.2]. Preparat ten został również szczegółowo przebadany w reakcji bioredukcji wybranych ketonów oraz α- i β-ketoestrów [Załącznik numer 3, II.A.a.6].

Efektem współpracy z dr Renatą Kołodziejską z Katedry Biologii i Biochemii Medycznej Collegium Medicum w ramach tego projektu jest 6 oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) [Załącznik numer 3, II.A.a.2, 3, 5, 6, 9, 11], szereg prac, głównie poglądowych w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie JCR [Załącznik numer 3, II.C.a.1; II.C.b.5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14] oraz doniesień zjazdowych.

2) Nowe etery oksymów o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej

W ramach tego projektu otrzymano serię O-benzylowych eterów oksymu 2-tiofenyloetanonu oraz przebadano je w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej [Załącznik numer 3, II.A.a.7]. Izomer *E* oksymu otrzymano w reakcji 2-tiofenyloetanonu z chlorowodorkiem hydroksyloaminy, a następnie poddano go reakcji z odpowiednimi podstawionymi halogenkami benzylu. W wyniku tych reakcji otrzymano 8 nowych eterów oksymów, które zostały poddane badaniom biologicznym. Najbardziej aktywny przeciwko *C. albicans* okazał się oksym ($MIC = 32 \mu g/mL$). Najsilniejsze działanie przeciwko *S. aureus* wykazał eter zawierający grupę CF_3 w położeniu 4 pierścienia fenyłowego, natomiast przeciwko *E. coli* eter zawierający atom Br w tym samym położeniu.

Dla otrzymanych wcześniej O-benzylowych eterów oksymu 1-(benzofuran-2-ylo)etan-1-onu zawierających różne podstawniki w pierścieniu fenyłowym wyznaczono również parametry lipofilowości, korzystając z wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP HPLC). Badania prowadzono z udziałem trzech różnych modyfikatorów organicznych: metanolu, izopropanolu i acetonitrylu. Porównanie otrzymanych wartości z danymi obliczeniowymi wykazało, że zarówno parametry określone doświadczalnie jak i obliczone są silnie dodatnio skorelowane. Analizy wykazały, że wszystkie uzyskane wyniki są podobne, jednak najsłabszą korelację ze wszystkimi danymi wykazuje $\log w$ w metanolu. [Załącznik numer 3, II.A.a.8].

Opracowana została również nowa nietermiczna metoda otrzymywania eterów oksymów z łatwo dostępnych i tanich chlorków alkilowych i funkcjonalizowanych. Reakcja prowadzona była z KOH z katalityczną ilością KI w DMSO. Stosując nową metodę otrzymano 24 nowe etery oksymów z wydajnościami 85-96% [Załącznik numer 3, II.A.a.10].

Efektem współpracy z dr Tomaszem Kosmałskim z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Collegium Medicum w ramach tego projektu są 3 oryginalne prace opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) [Załącznik numer 3, II.A.a.7, 8, 10] oraz szereg doniesień zjazdowych.

6. Literatura cytowana

- Abrahmsen L, Nilson J, Opperman U, Svensson S. 2005. Methods for the protein production and purification of soluble recombinant polypeptides. Patent WO2005068646 A, 28 July 2005.
- Anderson A, Walker BR. 2013. 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Drugs* 73 1385–1393.
- Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR. 2003. Effects of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88 285–291.
- Al-Ansary GH, Ismail MAH, Abou El Ella DA, Eid S, Abouzid KAM. 2013. Molecular design and synthesis of HCV inhibitors based on thiazolone scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 68 12–32.
- Barf T, Vallgård J, Edmont R, Häggström C, Kurz G, Nygren A, Larwood V, Mosialou E, Axelsson K, Olsson R, Engblom L, Edling N, Rönquist-Nii Y, Öhman B, Alberts P, Abrahmsén L. 2002. Arylsulfonamidothiazoles as a new class of potential antidiabetic drugs. Discovery of potent and selective inhibitors of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Med Chem* 45 3813–3815.
- T. Böhme, C.K. Engel, G. Farjot, S. Güssregen, T. Haack, G. Tschank, K. Ritter. 2013. 1,1-Dioxo-5,6-dihydro-[4,1,2]oxathiazines, a novel class of 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of diabetes. *Bioorg Med Chem Lett* 23 4685–4691.
- Chen S, Chen L, Le N, Zahao C, Sidduri A, Ping Lou J, Michoud C, Portland L, Jackson N, Liu J, Konzelmann F, Chi F, Tovar C, Xiang Q, Chen Y, Wen Y, Vassilev LT. 2007. Synthesis and activity of quinolinyl-methyne-thiazolinones as potent and selective cyclin dependent kinase 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17 2134–2138.
- Dabholkar VV, Shah SD, Dave VM. 2015. Lacatums of thiazol-4-ones. *Der Pharma Chemica* 7 163–166.
- Danel K, Pedersen EB, Nielsen C. 1998. Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of Novel 2,3-Dihydro-7H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-7-ones. *J Med Chem* 41 191–198.
- Den Boyer JA, Vahlne J-O, Post P, Heck AH, Daubenton F, Olbrich R. 2000. Ritanerlin as add-on medication to neuroleptic therapy for patients with chronic or subchronic schizophrenia. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp.* 15 179–189.
- Diederich S, Grossmann C, Hanke B, Quinkler M, Herrmann M, Bahr V, Oelkers W. 2000. In the search for specific inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenases (11beta-HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11beta-HSD-I. *Eur J Endocrinol* 142 200–207.
- Fotsch C, Wang M. 2008. Blockade of glucocorticoid excess at the tissue level: Inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a therapy for type 2 diabetes. *J Med Chem* 51 4852–4857.
- Giziewicz J, Wnuk SF, Robins MJ. 1999. Nucleic Acid Related Compounds. 107. Efficient Nitration of Uracil Base and Nucleoside Derivatives(1). *J Org Chem* 64 2149–2151.
- Hale C, Véniant M, Wang Z, Chen M, McCormick J, Cupples R, Hickman D, Min X, Sudom A, Xu H, Matsumoto G, Fotsch C, St Jean DJ, Wang M. 2008. Structural characterization and pharmacodynamic effects of an orally active 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor. *Chem Biol Drug Des* 71 36–44.
- Jean DJ, Yuan C, Bercot EA, Cupples R, Chen M, Fretland J, Hale C, Hungate RW, Komorowski R, Veniant M, Wang M, Zhang X, Fotsch C. 2007. 2-(S)-Phenethylaminothiazolones as potent, orally efficacious inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Med Chem* 50 429–432.
- Johansson L, Fotsch C, Bartberger DM, Castro VM, Chen M, Emery M, Gustafsson S, Hale C, Hickman D, Homan E, Jordan SR, Komorowski R, Li A, McRae K, Moniz G, Matsumoto G, Orihuela C, Palm G, Veniant M, Wang M, Williams M, Zhang J. 2008. 2-Amino-1,3-thiazol-4(5H)-ones as potent and selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: Enzyme-ligand co-crystal structure and demonstration of pharmacodynamic effects in C57Bl/6 mice. *J Med Chem* 51 2933–2943.
- Kennis LEJ, Vandenberk J, Mertens JK. 1984. *Eur Pat Appl EP* 110 435; *Chem Abstr* 1985. 102 594.
- Kotelevtsev Y, Brown RW, Fleming S, Kenyon C, Edwards CRW, Seckl JR, Mullins JJ. 1999. Hypertension in mice lacking 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Clin Invest* 103 683–689.
- Levshin IB, Grigor'eva IV, Tsurkan AA, V'yunov KA, Ginak AI. 1985. Investigation of the reactivities and tautomerism of azolidones. 52. Synthesis of 2- and 3-allyl-substituted pseudothiohydantoins. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 21 277 – 279.
- Navarrete-Vázquez G, Morales-Vilchis MG, Estrada-Soto S, Ramírez-Espinosa JJ, Hidalgo-Figueroa S, Nava-Zuazo C, Tlahuext H, Leon-Rivera I, Medina-Franco JL, López-Vallejo F, Webster SP, Binnie M, Ortiz-Andrade R, Moreno-Díaz H. 2014. Synthesis of 2-{2-[(α / β -naphthalen-1-ylsulfonyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl}acetamides with 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition and in combo antidiabetic activities. *Eur J Med Chem* 74 179–186.
- PASS on line. <http://www.pharmaexpert.ru/passonline>.
- Pecorari P, Rinaldi M, Costantino L, Provvisionato A, Cermelli C, Portolani M. 1991. Synthesis and biological activity of pyrimido[2,1-b][1,3]thiazine, [1,3]thiazino[3,2-a]purine and [1,2,3]triazolo[4,5-d][1,3]thiazino[3,2-a]pyrimidine derivatives and thiazole analogues. *Il Farmaco* 46 899–911.
- Ram VJ, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ. 1987. Syntheses and activities of novel pyrimidines derived from 5-cyano-6-aryl-2-thiouracil. *Ann Chem* 797–801.
- Russo F, Guccione S, Romeo G, Uccello Barretta G, Pucci S, Caruso A, Amico-Roxas M, Cutuli V. 1993. Pyrazolothiazolopyrimidine derivatives as a novel class of anti-inflammatory or antinociceptive agents: synthesis, structural characterization and pharmacological evaluation. *Eur J Med Chem* 28 363–376.
- Scott J, Goldberg FW, Turnbull AV. 2014. Medicinal chemistry of inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1). *J Med Chem* 57 4466–4486.
- Seperic M. 1972. 5-Oxo-2,3-dihydro-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine. D.E. Patent 21 40 601; *Chem Abstr* 77 5516.
- Sharma ST, Nieman LK, Feelders RA. 2015. Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management. *Clin Epidemiol* 7 281–293.
- Shiau CY, Chern JW, Liu KCh, Chan ChH, Yen MH. 1990. Studies on quinazolinones. 2. Synthesis of 2-(4-benzylpiperazin-1-ylmethyl)-2,3-dihydro-5H-oxazolo[2,3-b]quinazolin-5-one and -2,3-dihydro-5H-thiazolo[2,3-b]quinazolin-5-one. *J Heterocycl Chem* 27 1467–1472.

Yuan C, St Jean DJ, Liu Q, Cai L, Li A, Han N, Moniz G, Askew B, Hungate RW, Johansson L, Tedenborg L, Pyring D, Williams M, Hale C, Chen M, Cupples R, Zhang J, Jordan S, Bartberger M, Sun Y, Emery M, Wang M, Fotsch C. 2007. The discovery of 2-anilinothiazolones as 11 β -HSD1 inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 17 6056-6061.

Reube Shiduyde