



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU



Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej  
Katedra i Zakład Chemii Organicznej

**dr n. farm. Marcin Mączyński**

**Poszukiwanie nowych pochodnych izoksazolu  
o działaniu immunomodulującym**

**Załącznik nr 2**

Autoreferat w języku polskim

Wrocław 2018

## SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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.) .....	5
A) Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
B) Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego.....	5
C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	26
5. Piśmiennictwo.....	37

## 1. Imię i nazwisko

MARCIN MĄCZYŃSKI

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

- A) **Dyplom i tytuł zawodowy magistra farmacji**, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, nr 3259/F, Wrocław 25.06.1999 r.
- B) **Uzyskanie prawa wykonywania zawodu farmaceuty XVII/968/1623/01** (nowy nr PWZF 17012607), Dolnośląska Izba Aptekarska, Wrocław, 2001 r.
- C) **Dyplom i stopień doktora nauk farmaceutycznych** uzyskany na podstawie rozprawy: „Synteza i aktywność immunomodulująca nowych pochodnych izoksazolu”. Promotor pracy prof. dr hab. Stanisław Ryng, Katedra i Zakład Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2007 r.
- D) **Dyplom i tytuł menedżera projektu badawczo-rozwojowego**; Studia podyplomowe na kierunku: „Menedżer projektu badawczo-rozwojowego” zrealizowane w Wyższej Szkole Bankowej we Wrocławiu, 2013 r.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

### 3.1. Przebieg pracy zawodowej:

01.10.1999 – 30.09.2007 - **Asystent** w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z OAM Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

01.10.2007 – 30.09.2018 - **Adiunkt** w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

od 01.10.2018 – **pełniący obowiązki Kierownika** Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

1999 r. – obecnie, farmaceuta w aptece

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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**

**Poszukiwanie nowych pochodnych izoksazolu o działaniu immunomodulującym**

**B) Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego**

Podstawę osiągnięcia naukowego stanowi monotematyczny cykl 6 publikacji oraz 1 udzielony patent. Prace opublikowano w latach 2014-2018. Odnośniki do prac z cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe oznaczone zostały przedrostkiem **H**. Dla wszystkich cytowanych prac, których jestem współautorem, podano wartości współczynnika wpływu *Impact factor* (IF) czasopism, w których się ukazały (według Journal Citation Reports), zgodnie z rokiem publikowania oraz punkty MNiSW/KBN. Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku nr 4. Oświadczenia współautorów prac określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie znajdują się w Załączniku nr 6.

**H1. Marcin Mączyński\***, Stanisław Ryng, Jolanta Artym, Maja Kocięba, Michał Zimecki, Katarzyna Brudnik, Jerzy T. Jodkowski†: New lead structures in the isoxazole system: relationship between quantum chemical parameters and immunological activity. *Acta Pol.Pharm.* **2014** Vol.71 no.1; s.71-83

IF<sub>2014</sub>: 0.737, Pkt. MNiSW/KBN: 15

**H2. Marcin Mączyński\***, Jolanta Artym, Maja Kocięba, Aleksandra Sochacka-Ćwikła, Ewa Drozd-Szczygieł, Stanisław Ryng, Michał Zimecki: Synthesis and immunoregulatory properties of selected 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid benzylamides. *Acta Pol.Pharm.* **2016** Vol.73 no.5; s.1201-1211

IF<sub>2016</sub>: 0.745, Pkt. MNiSW/KBN: 15

**H3. Marcin Mączyński\***, Jolanta Artym, Maja Kocięba, Iwona Kochanowska, Stanisław Ryng, Michał Zimecki: Anti-inflammatory properties of an isoxazole derivative - MZO-2. *Pharmacol.Rep.* **2016** Vol.68 no.5; s.894-902

IF<sub>2016</sub>: 2.587, Pkt. MNiSW/KBN: 25

**H4.** Angelika Drynda\*, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Ewa Zaczyńska, Michał Zimecki, Iwona Kochanowska, Stanisław Ryng, **Marcin Mączyński**: 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid hydrazide derivatives with in vitro immunomodulatory activities. *Chem.Biol.Drug Des.* **2017** Vol.89 no.5; s.705-713

IF<sub>2017</sub>: 2.328, Pkt. MNiSW/KBN: 25

**H5. Marcin Mączyński\***, Sylwia Borska, Katarzyna Mieszala, Maja Kocięba, Ewa Zaczyńska, Iwona Kochanowska, Michał Zimecki: Synthesis, immunosuppressive properties, and mechanism of action of a new isoxazole derivative. *Molecules* **2018** Vol.23 no.7; art.1545 [14 s.]

IF<sub>2018</sub>: 3.098, Pkt. MNiSW/KBN: 30

**H6. Mączyński Marcin\***, Ryng Stanisław, Zimecki Michał, Sochacka-Ćwikła Aleksandra  
**Patent** numer PAT.229424 udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej na wynalazek pt.: Nowa pochodna kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksyłowego, sposób jej wytwarzania i zastosowanie, Warszawa **2018**

**H7.** Michał Zimecki, Urszula Bąchor, **Marcin Mączyński\***: Isoxazole derivatives as regulators of immune functions. *Molecules* **2018** Vol.23 no.10; art.2724 [17 s.]

IF<sub>2018</sub>: 3.098, Pkt. MNiSW/KBN: 30

**Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) przedstawionych opracowań wynosi: 12.593**

**Pkt. MNiSW/KBN: 140**

## C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

### Cel prowadzonych badań

Zamieszczone poniżej opracowanie zawiera zwięzłe omówienie uzyskanych wyników z podkreśleniem ich istotności. Wszystkie szczegółowe informacje takie jak przepisy preparatywne, dokumentacja spektralna, tabele z wynikami, metodyka badań oraz opisy testów farmakologicznych są zamieszczone w wyżej wymienionych publikacjach i ich suplementach.

Przedstawione badania zostały podjęte w celu otrzymania nowych pochodnych izoksazolu (1,2-oksazolu) o potencjalnej aktywności immunologicznej i obejmowały:

1. Syntezę nowych pochodnych izoksazolu (**H1-H6**)
2. Potwierdzenie struktur oraz czystości otrzymanych pochodnych poprzez analizę danych spektroskopowych (magnetyczny rezonans jądrowy -  $^1\text{H}$ NMR i  $^{13}\text{C}$ NMR, spektroskopia w podczerwieni - IR, rentgenografia strukturalna, analiza elementarna oraz spektrometria mas - MS) (**H1-H6**)
3. Określenie aktywności biologicznej w oparciu o wykonane modele doświadczalne (**H1-H6**)
4. Analizę zależności struktura-aktywność otrzymanych związków, która pozwala na zidentyfikowanie fragmentów strukturalnych pożądaných z punktu widzenia działania biologicznego, a jej wyniki umożliwią bardziej racjonalne projektowanie kandydatów na nowe leki immunomodulujące (**H1-H5**)
5. Wytypowanie najaktywniejszych pochodnych w celu wykonania dodatkowych badań biologicznych *in vivo* oraz *in vitro* oraz poszukiwania ich mechanizmu działania na układ immunologiczny (**H2-H5**)
6. Określenie struktur wiodących w grupie pochodnych izoksazolu działających na układ immunologiczny (**H1-H6**)
7. Przeprowadzenie studium literaturowego poświęconego usystematyzowaniu aktualnej wiedzy o pochodnych izoksazolu wykazujących działanie na układ immunologiczny (**H7**)

## **Uzyskane wyniki**

W ciągu ostatnich lat obserwujemy ogromny postęp w rozpoznawaniu etiologii oraz leczeniu wielu chorób. Pomimo tego wciąż jeszcze są obszary nie do końca zbadane. Choroby immunologiczne rzadko kojarzone są jako śmiertelne, jednak są niezwykle uciążliwe, praktycznie nieuleczalne, powodujące ogromny dyskomfort, nie tylko fizyczny, ale również psychiczny. Układ immunologiczny zapewnia organizmowi ochronę przed czynnikami rozpoznawanymi jako obce. Sprawnie działający układ immunologiczny rozpoznaje je i eliminuje z organizmu. Zaburzenia jego funkcji, polegające na niedostatecznej albo nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, prowadzą do wystąpienia zaburzeń immunologicznych, które mogą powodować różnego typu choroby. Niedobory immunologiczne związane są z niedostateczną odpowiedzią humoralną (wytwarzanie immunoglobulin i przeciwciał), aktywacją dopełniacza (komplementu) lub z niedostateczną odpowiedzią komórkową (upośledzenie aktywności limfocytów T). Zaburzenia te mogą występować pojedynczo lub razem. Istnieje wiele chorób wynikających z zaburzeń immunologicznych, a spowodowane są one wpływem środowiska (alergie) i autoagresją czyli wytwarzaniem przeciwciał skierowanych przeciwko składnikom własnych narządów i tkanek (reumatoidalne zapalenie stawów, anemia hemolityczna, trombocytopenia samoistna, toczeń rumieniowaty, guzkowate zapalenie tętnic, łuszczyca i wiele innych). W leczeniu chorób wywołanych autoagresją oraz w transplantologii stosowane są leki immunosupresyjne, czyli obniżające odpowiedź układu immunologicznego.

Najczęściej stosowane leki immunosupresyjne należą do różnorodnych grup chemicznych np. cyklosporyna A jest cyklicznym polipeptydem, takrolimus zaś antybiotykiem makrolidowym, pimekrolimus pochodną makrolaktamu askomycyny. Wszystkie wymienione leki posiadają wiele działań niepożądanych wynikających z ich nieselektywnego działania oraz budowy wielkocząsteczkowej. Takrolimus oraz pimekrolimus sklasyfikowane są jako inhibitory kalcyneuryny [1, 2]. W przypadkach zastosowań miejscowych inhibitory kalcyneuryny są często stosowane zamiennie ze steroidami, które także charakteryzują się wieloma działaniami niepożądanymi [3]. Dlatego tak ważnym celem badawczym w poszukiwaniu nowych leków immunomodulujących jest synteza struktur małocząsteczkowych, które mogą zastąpić inhibitory kalcyneuryny oraz steroidy, ale o innym mechanizmie działania, wysokiej selektywności i braku działań niepożądanych [4]. Jednym z kierunków badań realizowanych w wielu ośrodkach



naukowych jest poszukiwanie biologicznie aktywnych związków w grupie pochodnych izoksazolu.

Związki zawierające pierścień izoksazolu [5] są źródłem różnych leków, które znalazły zastosowanie w leczeniu infekcji i chorób o różnej etiologii. Synteza, klasyfikacja, mechanizm działania i zastosowanie terapeutyczne zarejestrowanych pochodnych izoksazolu, jak i będących w trakcie badań klinicznych, zostały ostatnio opisane w kilku pracach [6-10]. Analizując cytowane prace można stwierdzić, że szerokie spektrum działania związków zawierających pierścień izoksazolu obejmuje między innymi aktywność przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwhistaminową, przeciwgruźliczą, przeciwpadaczkową, przeciwwirusową, przeciwłękową, przeciwzapalną, immunostymulującą oraz immunosupresyjną.

Najbardziej znaną pochodną izoksazolu o aktywności immunosupresyjnej jest Leflunomid i jego aktywny metabolit Teryflunomid [11], które znalazły terapeutyczne zastosowanie w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów [12] oraz w transplantologii [13]. Leflunomid jest szeroko stosowany jako lek referencyjny w celu porównania aktywności nowo badanych pochodnych izoksazolu.

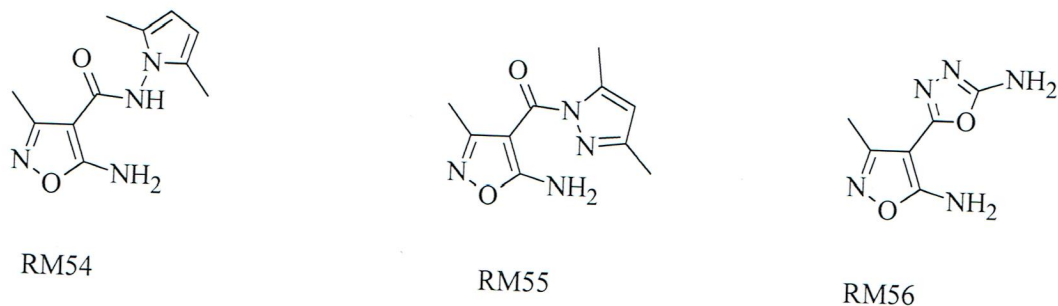
Nadrzędnym celem moich badań było otrzymanie nowych, nietoksycznych pochodnych izoksazolu. Wprowadzenie do terapii bezpiecznych oraz działających selektywnie leków może wpłynąć na powstanie nowych protokołów leczniczych.

Poszukiwania aktywnych struktur w grupie pochodnych izoksazolu rozpocząłem od syntezy nowych związków (**H1-H6**). W przedstawionych pracach nie opisałem podejmowanych prób mających na celu optymalizację metod syntezy w celu poprawy wydajności procesów (opublikowane zostały metody z najlepszych eksperymentów). Strukturę nowo otrzymanych pochodnych potwierdziłem metodami spektralnymi  $^1\text{H}$ NMR oraz  $^{13}\text{C}$ NMR, IR, analizą elementarną a także dla wybranych struktur wykonano badania MS oraz analizę rentgenostrukturalną. Kolejnym etapem było określenie aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych izoksazolu, ocena cytotoksyczności na wybranych liniach komórkowych, zaproponowanie możliwego mechanizmu działania oraz określenie kierunku dalszych badań (**H1-H6**). Pochodne izoksazolu, a szczególnie pochodne kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego, wykazują aktywność regulującą na układ immunologiczny. Aktywność tą możemy podzielić na kilka kategorii, z uwzględnieniem określonego kierunku działania, immunosupresyjną (**H1, H2, H5**), przeciwzapalną (**H3, H6**) oraz immunomodulującą (**H2, H4**).

Otrzymane związki przebadano w różnych modelach doświadczalnych wykorzystując komórki rezydujące w organach limfatycznych gryzoni, ludzkiej krwi obwodowej, linii komórkowe i eksperymentalne modele chorób zwierzęcych, odpowiadające sytuacjom klinicznym u ludzi. W pracach przedstawiano tylko wyniki dla najaktywniejszych pochodnych, z pominięciem związków toksycznych czy nie wykazujących aktywności w opisywanych modelach na układ immunologiczny. Korzystne cechy opisanych pochodnych izoksazolu obejmują niską toksyczność i skuteczną bioaktywność w niskich dawkach. W większości wykonanych badań aktywność testowanych związków była porównywalna lub nawet wyższa niż stosowanych leków referencyjnych. W przypadku, kiedy było to możliwe, zaproponowano prawdopodobny mechanizm działania badanych związków i ich potencjalną użyteczność terapeutyczną.

Podsumowaniem przedstawionego planu badawczego było przeprowadzenie studium literaturowego poświęconego usystematyzowaniu aktualnej wiedzy o pochodnych izoksazolu wykazujących działanie na układ immunologiczny, a także pokazaniu wpływu swoich badań na ogólnoswiatowe badania nad niskocząsteczkowymi i aktywnymi immunologicznie pochodnymi izoksazolu (H7).

W celu potwierdzenia założenia, że pierścień izoksazolu odgrywa kluczową rolę w działaniu na układ immunologiczny wykonałem badania mające na celu określenie czy w zsyntezowanych pochodnych o stwierdzonej aktywności immunologicznej to pierścień izoksazolu czy podstawione w jego układzie podstawniki determinują opisywaną aktywność biologiczną. Pierwszy etap mojej pracy (H1) obejmował syntezę trzech pochodnych izoksazolu: RM54, RM55, RM56, różniących się podstawnikami w pozycji 4 (Rys. 1). Związkiem wyjściowym był 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohydryd (zwyczajowo hydrazyd kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego, HIX), który w reakcji z odpowiednimi substratami prowadził do otrzymania oczekiwanych produktów. W reakcji z heksano-2,5-dionem powstał 5-amino-3-metylo-4-[(2,5-dimetylopirolo)aminokarbonylo]izoksazol (RM54), z pentano-2,4-dionem - 5-amino-3-metylo-4-[(3,5-dimetylopirazolo)karbonylo]izoksazol (RM55), natomiast w reakcji z bromocyjanem 5-amino-3-metylo-4-[2-(5-amino-1,3,4-oksadiazolo)]izoksazol (RM56).



Rys. 1 Struktura 4-podstawionych pochodnych 5-amino-3-metyloizoksazolu (RM54, RM55, RM56)

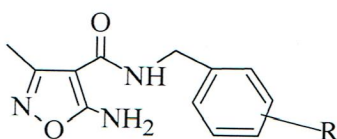
Dla zsyntetyzowanych pochodnych wykonano testy aktywności immunologicznej. Badano wpływ związków na indukowaną fitohemaglutyniną (PHA) proliferację jednojądrzastych ludzkich komórek krwi obwodowej, wtórną humoralną odpowiedź immunologiczną splenocytów mysich, używając erytrocytów barana (SRBC) oraz w teście karageninowym obrzęku stopy. Wszystkie związki wykazały zależną od dawki zdolność hamowania proliferacji jednojądrzastych ludzkich komórek krwi obwodowej. W modelu wtórnej humoralnej odpowiedzi immunologicznej splenocytów mysich pochodne wykazały w dawkach 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$  aktywność immunosupresyjną wyższą od zastosowanego leku referencyjnego Leflunomidu (jego aktywność wynosiła odpowiednio 70 i 87% dla dawki 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Efekt działania supresyjnego związków wyniósł odpowiednio dla dawek 10 i 100  $\mu\text{g/ml}$ : RM54 – 50 i 65%, RM55 – 64 i 48% oraz RM56 – 39 i 89%. W teście karageninowym tylko dwa związki RM54 i RM56 charakteryzowały się silną aktywnością przeciwzapalną. **Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, iż badane pochodne wykazują zależną od dawki silną aktywność immunosupresyjną oraz przeciwzapalną.** Mechanizm działania prawdopodobnie różni się od immunosupresyjnego mechanizmu działania Leflunomidu, ponieważ opisywane związki znacząco stymulują interleukinę 6 (IL-6) (dane niepublikowane), która kontroluje procesy zapalne przez stymulację produkcji białek ostrej fazy [14].

W celu określenia zależności pomiędzy parametrami kwantowo-chemicznymi a aktywnością immunologiczną wykonano obliczenia kwantowo-mechaniczne (H1). Zastosowano teorię funkcjonału gęstości (DFT), będącą jedną z kwantowo-mechanicznych metod służącą do modelowania struktury cząsteczki chemicznej. Teoria DFT zakłada, że wszystkie własności układu kwantowego w stanie stacjonarnym wynikają z gęstości elektronowej stanu podstawowego.

DFT zastosowano aby wykazać właściwości molekularne badanych związków. Parametry geometryczne zostały w pełni zoptymalizowane przy użyciu potencjału hybrydowego B3LYP przy bazie funkcyjnej 6-311G(d,p) używanego do obliczeń cząsteczek organicznych. Rozkład ładunku atomowego (zmiany w lokalnej gęstości elektronowej) w pochodnych RM54, RM55, RM56, uzyskany na podstawie analizy populacji Mullikena, został skorelowany z prezentowaną aktywnością immunologiczną opisywanych pochodnych izoksazolu. Obliczenia wykonano celem określenia zależności pomiędzy strukturą chemiczną związków a ich aktywnością biologiczną. W pracy przedstawiłem parametry strukturalne najbardziej stabilnych konformerów skalkulowane przy użyciu B3LYP/6-311G(d,p). Wszystkie obliczenia kwantowo-mechaniczne *ab initio* zostały wykonane przy użyciu programu Gaussian 09. Wyniki wykonanych obliczeń *ab initio*, w tym zoptymalizowane parametry geometryczne, częstotliwości drgań harmonijnych, stany obrotowe, moment dipolowy, pionowe potencjały jonizacji i suma energii w 0K dostarczyły informacji na temat rozkładu ładunku elektronów w cząsteczkach RM54, RM55, RM56. Atomy tlenu (O) i azotu (N) w pierścieniu izoksazolu są najbardziej charakterystycznymi punktami oraz negatywnymi centrami zdolnymi do formowania stabilnych kompleksów z wodą lub innymi polarnymi rozpuszczalnikami. Wyniki tych obliczeń wskazują dlaczego ładunki atomowe na atomach O i N powinny być skorelowane z aktywnością immunologiczną opisywanych pochodnych izoksazolu. Analiza rozkładu ładunków atomowych na atomie O i N w cząsteczkach RM54, RM55, RM56 ujawniła wpływ tych miejsc w cząsteczkach w modelu indukowanej PHA proliferacji jednojądrzastych ludzkich komórek krwi obwodowej. We wszystkich stężeniach związków rozpuszczonych w dimetylosulfotlenku (DMSO) korelacja liniowa zachowuje ważność. W przypadku testu wtórnej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej splenocytów mysich na SRBC oraz w teście karageninowym aktywność biologiczna zależała od rozkładu ładunków na większej liczbie atomów pierścienia izoksazolowego. W badaniach stwierdzono, że są to atomy O1, N2, C3 (węgiel C5 izoksazolu) i C8 (węgiel C3 izoksazolu). **Analizując wyniki badań wydaje się, że istnieje wprost proporcjonalna korelacja pomiędzy rosnącą aktywnością immunologiczną  $RM55 < RM54 < RM56$ , a sumą ładunków atomowych w pierścieniu izoksazolowym.**

Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują na farmakoforową rolę pierścienia izoksazolu w opisywanych modelach aktywności immunologicznej dla tej grupy związków (H1).

Bazując na swoich dotychczasowych badaniach w pracy (H2) opisałem syntezę i badania biologiczne nowej serii pochodnych izoksazolu. Wymiernym wynikiem tych badań jest także uzyskany patent (H6) dotyczący struktury i aktywności biologicznej 5-amino-3-metylo-N-(4-metylobenzylo)izoksazolo-4-karboksamidu (MO5). Zsyntezowałem serię podstawionych benzyloamidów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego (MO1-10). Substratem był azyd kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego, który w reakcjach z pochodnymi benzyloaminami dał oczekiwane związki MO1-10 (Rys. 2) (H2).

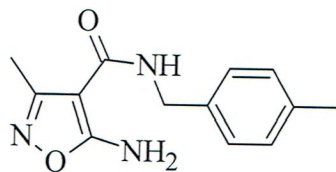


Rys. 2 Seria związków MO1-10

Celem tej modyfikacji było sprawdzenie wpływu wprowadzenia fragmentu metylenowego i odsunięcia grupy aromatycznej od grupy amidowej w pozycji 4 kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego na aktywność biologiczną. Zmiana ta spowodowała możliwość większej rotacji podstawnika arylowego oraz prawdopodobnie lepszego dopasowania do miejsca wiążącego. Dla wszystkich związków (MO1-10) wykonano podstawowe testy immunologiczne *in vitro* i *in vivo*, w modelu mysim i ludzkim. Otrzymane wyniki wskazują, że badane związki w zakresie stężeń 1-100  $\mu\text{g/ml}$  nie powodują zwiększonej śmiertelności jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Co więcej, w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  zaznaczył się paradoksalnie dodatni wpływ związków na żywotność komórek. Związki posiadały zróżnicowane, zależne od dawki, właściwości supresorowe w teście proliferacji PBMC indukowanym PHA. Hamowanie proliferacji widoczne było już od stężenia 10  $\mu\text{g/ml}$ . Działanie niektórych związków w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  powodowało całkowite zahamowanie proliferacji indukowanej tym mitogenem. Mniejszą aktywność supresyjną wykazały związki MO1 (zawiera niepodstawione ugrupowanie benzytowe), MO7 (zawiera podstawnik 4-fluorobenzytowy) i MO10 (zawiera grupę 3-trifluorometylobenzyłową). Pozostałe są inhibitorami o umiarkowanej aktywności. W modelu hodowli pełnej krwi ludzkiej indukowanej lipopolisacharydem (LPS) zaobserwowano zróżnicowany wpływ na produkcję czynnika nekrozy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) oraz IL-6. W przypadku wpływu związków na indukowaną LPS produkcję TNF- $\alpha$  oraz IL-6 dało się

zauważyć zróżnicowane, zależne od dawki efekty, w większości hamujące (w szczególności przy stężeniu 100 µg/ml). Pochodne MO6 (posiada fragment 4-metoksybenzylowy) i MO9 (posiada grupę 2,4-dimetoksybenzylową) prezentowały efekty stymulujące w niższych dawkach (10 µg/ml). Interesujące jest to, że w dawce 100 µg/ml aktywność immunostymulująca zanika. Z kolei związek MO8 (posiada grupę 2-metoksybenzylową) stymulował produkcję cytokin dopiero w wyższych dawkach (100 µg/ml). **Z przeprowadzonej analizy zależności struktura-aktywność wynika, że obecność ugrupowania metoksyłowego w pierścieniu fenyłowym determinuje immunostymulującą aktywność opisywanych pochodnych.** Wyjątkowe właściwości hamujące produkcję TNF- $\alpha$  przejawiał MO5 (posiada podstawnik 4-metylobenzylowy) już w dawce 1 µg/ml. Pochodne MO2 (posiada ugrupowanie 4-chlorobenzylowe), MO4 (ma grupę 3-chlorobenzylową), wykazały podobne do siebie, ale umiarkowane efekty inhibitorowe.

**Reasumując, można stwierdzić, iż związki wykazały właściwości antyproliferacyjne i przeciwzapalne przy braku toksyczności wobec PBMC.** Najbardziej aktywny okazał się 5-amino-3-metylo-N-(4-metylobenzyl)izoksazolo-4-karboksamid (MO5), Rys. 3, biorąc pod uwagę zarówno aktywność antyproliferacyjną, jak i hamowanie produkcji TNF- $\alpha$ , dlatego też został on wytypowany do dalszych testów *in vivo* oraz *in vitro*.



Rys. 3 Struktura związku MO5

Badanie cytotoksyczności MO5 wobec ludzkich, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej nie wykazało obniżenia żywotności tych komórek w zakresie stężeń od 1 do 100 µg/ml. Związek ten wykazał natomiast umiarkowany, hamujący wpływ na wzrost linii nowotworowych raka jelita SV948 oraz białaczki limfatycznej L-1210. Jako lek referencyjny użyto Cisplatynę. Stosunkowo szybko uzyskano efekt hamujący wzrost linii SV948, już w dawce 25 µg/ml. Zwiększanie dawki nie powodowało jednak dalszego hamowania wzrostu tej linii. W przypadku linii L-1210 efekt hamowania wzrostu był wyraźnie słabszy w porównaniu do leku referencyjnego.

Wyniki wpływu związku MO5 na humoralną, wtórną odpowiedź immunologiczną na SRBC *in vitro* wskazują na istotne hamowanie liczby komórek produkujących przeciwciała przez związek MO5 już w stężeniu 10 µg/ml. Natomiast w stężeniu 100 µg/ml efekt hamowania nie zwiększał się. Aktywność hamowania prezentowana przez związek kontrolny – cyklosporynę A była znacznie silniejsza w stężeniu 10 µg/ml. Związek MO5 powodował stymulację nadwrażliwości typu opóźnionego (DTH) na owoalbuminę (OVA), gdy podano go przed uczuleniem myszy. Jednakże, związek ten podany przed dawką wywołującą antygeny silnie hamował tę odpowiedź immunologiczną. Badanie wpływu związku MO5 na zapalenie karageninowe łapy u myszy pokazało, że związek MO5 w istotny sposób obniżał reakcję na karageninę. MO5 hamował znamienne wtórną, humoralną odpowiedź immunologiczną na SRBC *in vitro*, natomiast jego wpływ na nadwrażliwość typu opóźnionego był zróżnicowany, tzn. hamował on tylko efektorową fazę tego typu odpowiedzi. MO5 miał stymulujący wpływ na indukcyjną fazę DTH, ale silny wpływ hamujący na fazę efektorową tej odpowiedzi. Hamowanie odpowiedzi zapalnej na karageninę u myszy potwierdza jego silny charakter przeciwzapalny.

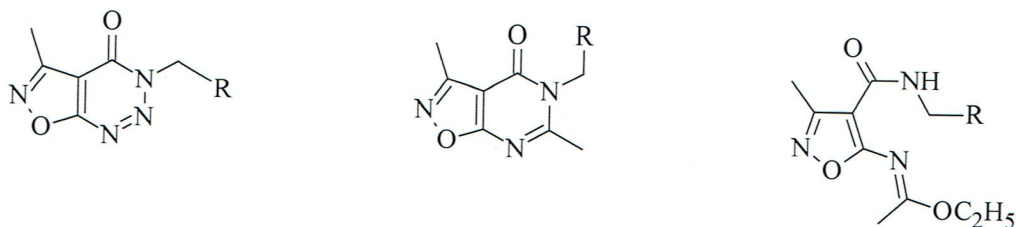
Uzyskane wyniki wskazują, że pochodna MO5 nie wpływa na proces indukcji odpowiedzi immunologicznej (prezentacja antygeny/ekspansja antygenowo-swoistych komórek T), a jego efekt supresorowy może polegać głównie na hamowaniu aktywności mediatorów zapalenia towarzyszących zarówno swoistej odpowiedzi immunologicznej (DTH na owoalbuminę), jak i nieswoistej (wczesna odpowiedź zapalna na karageninę). **Z analizy zależności struktura-aktywność związku MO5 wynika, że obecność ugrupowania 4-metylobenzylowego determinuje aktywność przeciwzapalną i antyproliferacyjną.** Reasumując, MO5 jest przykładem związku łączącego aktywność antyproliferacyjną i przeciwzapalną i stanowi interesujący obiekt do dalszych badań farmakologicznych (H6).

Wymiernym wynikiem przeprowadzonych badań jest uzyskany patent nr PAT.229424 udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej w 2018 roku na wynalazek pt.: Nowa pochodna kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyłowego, sposób jej wytwarzania i zastosowanie (H6).

**Z analizy struktura-aktywność opisywanej grupy związków MO1-10 wynika, że wprowadzenie fragmentu metylenowego pomiędzy ugrupowanie amidowe a fragment**

**aromatyczny bardzo korzystnie wpływa na aktywność tego typu pochodnych. Otrzymałem związki będące supresorami i stymulatorami odpowiedzi immunologicznej (H2).**

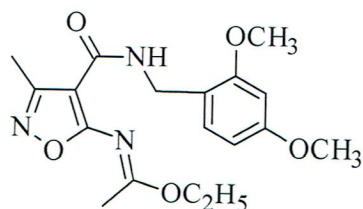
Kolejnym etapem pracy była synteza monocyklicznych (seria MZO) oraz bicyklicznych (serie MZ i MZA) pochodnych izoksazolu (**H3**). Substratem do syntezy wymienionych serii były opisywane wyżej podstawione benzyloamidy kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboxyowego (MO1-10). W literaturze podanych jest wiele metod syntezy tego typu pochodnych, ale moje doświadczenia dotyczące reaktywności pochodnych kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboxyowego potwierdziły obawy, że nie wszystkie zaplanowane szlaki syntetyczne zakończą się powodzeniem. Bardzo dużym problemem jest funkcjonalizacja grupy aminowej w pozycji 5 układu izoksazolu. Dogłębna analiza struktury 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohydrazynu (HIX) przeprowadzona przez nasz zespół wykazała, że grupa aminowa w pozycji 5 izoksazolu zachowuje się jak grupa iminowa. Z tego powodu wynika słaba reaktywność HIX w stosunku do reagentów nukleofilowych, a także niemożność otrzymania produktów reakcji ze związkami karbonyłowymi [15]. Modyfikowanie na bieżąco zaplanowanych metod syntezy pozwoliło mi na otrzymanie nowych związków, które zakwalifikowałem do trzech grup: seria MZA, seria MZ oraz seria MZO (Rys.3). W reakcji związków MO1-10 z ortoocetanem trietylu otrzymałem odpowiednio 5-podstawione pochodne 3,6-dimetyloizoksazolo[5,4-*d*]pirymidyn-4-onu (wytypowane do badań związki to MZ-1-4) oraz podstawione benzyloamidy kwasu 5-(1-etoksyetylidenoamino)-3-metyloizoksazolo-4-karboxyowego (wytypowane do badań związki to MZO-1-3). Z kolei związki MO1-10 w reakcji z azotanem(III) sodu (HCl, 0-5°C) zostały przekształcone w 5-podstawione pochodne 3-metyloizoksazolo[5,4-*d*][1,2,3]triazyn-4-onu (wytypowany do badań związek to MZA-1) Rys. 4. Spośród 25 otrzymanych pochodnych (dane niepublikowane), po wstępnych badaniach biologicznych (toksyczność, badania przesiewowe *in vitro*) do dalszych badań wytypowałem 8 pochodnych izoksazolu.



Rys. 4 Struktury trzech serii pochodnych izoksazolu MZA, MZ, MZO



Przeprowadzone zostały badania *in vitro* w modelach ludzkich, *in vivo* w modelach mysich oraz zaproponowano prawdopodobny mechanizm działania. Badanie cytotoksyczności związków wobec ludzkich, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej nie wykazało obniżenia żywotności tych komórek w zakresie stężeń od 1 do 100 µg/ml. Pochodne z opisywanych trzech grup posiadały zależne od dawki właściwości supresorowe w teście proliferacji PBMC indukowanej PHA. Najaktywniejszym związkiem w tych badaniach okazał się 2,4-dimetoksybenzyloamid kwasu 5-(1-etoksyetylidenoamino)-3-metyloizoksazolo-4-karboksyowego (MZO-2) (Rys. 5), który wykazał statystycznie znamiennej aktywność już w dawce 1 µg/ml.



Rys. 5 Struktura najaktywniejszej pochodnej serii MZO, związek MZO-2

3-metylo-5-(4-metylobenzylo)izoksazolo[5,4-*d*][1,2,3]triazyn-4(5H)-on (pochodna MZA-1) hamowała indukowaną PHA proliferację PBMC w znaczącym stopniu, ale dopiero w dawce 100 µg/ml. Natomiast w dawce 25 µg/ml MZA-1 hamowała w bardzo dużym stopniu indukowaną LPS produkcję TNF- $\alpha$ . W pozostałych przeprowadzonych badaniach farmakologicznych pochodna ta wykazała umiarkowaną aktywność. MZA-1 posiada ugrupowanie 4-metylobenzyłowe w pozycji 5 układu izoksazolo[5,4-*d*][1,2,3]triazyn-4-onu. Substratem do jego syntezy był najaktywniejszy związek serii MO1-10. Zaproponowana modyfikacja strukturalna nie wpłynęła na zwiększenie aktywności związku MZA-1 w opisywanych modelach doświadczalnych.

W serii pochodnych MZ, związki były nietoksyczne w dawce do 100 µg/ml wobec PBMC, a ich aktywność w opisywanych wyżej modelach była umiarkowana, zróżnicowana i zależna od dawki. W grupie MZ opisywane związki posiadały ugrupowanie 4-metylobenzyłowe (MZ-1), 4-chlorobenzyłowe (MZ-2), 4-metoksybenzyłowe (MZ-3) oraz 3-trifluorobenzyłowe (MZ-4) w pozycji 5 układu 3,6-dimetyloizoksazolo[5,4-*d*]pirymidyn-4-onu. **Reakcja cyklizacji związku MO5 do MZ-1 oraz MO6 do MZ-3 spowodowała zanik aktywności immunosupresyjnej**

oraz immunostymulującej. Można wnioskować, że modyfikacja strukturalna prowadząca do powstania układu bicyklicznego nie wpłynęła korzystnie na aktywność biologiczną w opisywanych związkach.

Spośród podstawionych benzyloamidów kwasu 5-(1-etoksyetylidenoamino)-3-metyloizoksazolo-4-karboksyowego pochodna MZO-1 (posiada ugrupowanie 4-metoksybenzylowe) nie wykazała znamiennej aktywności immunomodulującej. Substratem do syntezy MZO-1 był działający immunostymulująco związek MO6. Opisywana modyfikacja strukturalna okazała się niekorzystna.

Najbardziej interesujący okazał się 2,4-dimetoksybenzyloamid kwasu 5-(1-etoksyetylidenoamino)-3-metylo-4-izoksazolokarboksyowego (MZO-2), który demonstrował bardzo silny efekt antyproliferacyjny, ale nie wykazał zdolności hamowania indukowanej LPS produkcji TNF- $\alpha$ . Brak zdolności do hamowania TNF- $\alpha$  indukowanej LPS przez pochodną MZO-2 nie ma wpływu na przeciwzapalne działanie związku *in vivo*. *In vivo* MZO-2 nie hamował antygenowo swoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej, co jest pożądaną właściwością potencjalnego leku przeciwzapalnego. Interesujący wydaje się fakt, że substratem do jego syntezy był działający immunostymulująco już w dawce 10  $\mu\text{g/ml}$  związek MO9. Opisywana modyfikacja strukturalna całkowicie zmieniła profil aktywności biologicznej z immunostymulującej na immunosupresyjną i przeciwzapalną. Supresorowy wpływ związku MZO-2 na fazę indukcyjną nadwrażliwości typu późnego na OVA w dawce 50  $\mu\text{g/ml}$  jest niewielki i nie ma znaczenia przy ocenie wartości preparatu. Jest on związany prawdopodobnie z hamowaniem odczynu zapalnego indukowanego pełnym adiuwantem Freund'a. Należy podkreślić, że związek ten będzie przeznaczony do tłumienia już zaistniałych procesów zapalnych, a nie do ich zapobiegania. Aktywność związku MZO-2 w hamowaniu nadwrażliwości typu kontaktowego na oksazolon jest porównywalna do preparatu Protopic® (substancja czynna takrolimus) w dawce 0,1% jako maść przeciwzapalna. **Wyższość MZO-2 nad preparatem Protopic polega na całkowitym braku toksyczności w opisywanym modelu doświadczalnym. Przedstawione wyniki badań sugerują, że może on być stosowany w przypadku procesów zapalnych o nieznannej etiologii.**

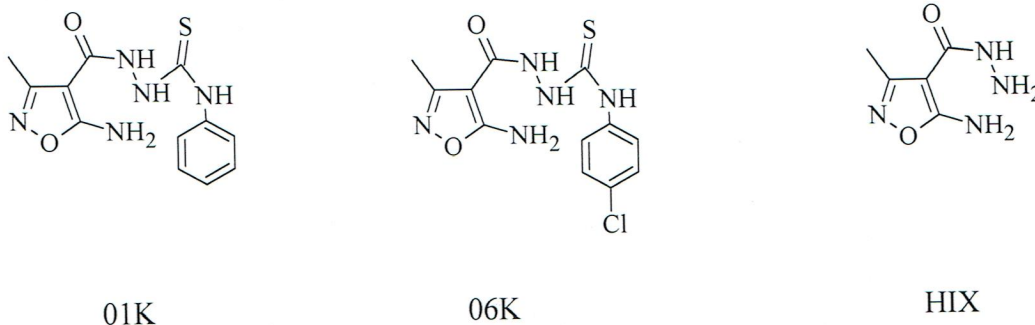
Dane literaturowe [16-18] wskazują, że pochodne izoksazolu są potencjalnymi inhibitorami stanu zapalnego wywołanego karageniną. W modelu karageninowego zapalenia łapy u myszy dawka 250  $\mu\text{g}$  związku MZO-2 hamowała reakcję zapalną w sposób porównywalny z lekiem

referencyjnym – deksametazonem. Działanie związku można przebiegać poprzez hamowanie degranulacji komórek tucznych, które odgrywają bardzo ważną rolę w tym procesie. Właściwości takie posiada systemowo stosowany Leflunomid [19]. Dodatkowe, niepublikowane badania wykazały, że związek MZO-2 nie jest selektywnym antagonistą cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2). **Opisane właściwości związku MZO-2 wskazują na jego silne działanie przeciwzapalne.** Prawdopodobnie związek ten może mieć zdolność hamowania produkcji chemokin czy ekspresji cząstek adhezyjnych i w ten sposób zapobiega infiltracji komórek zapalnych do miejsca osadzania się czynnika drażniącego, takiego jak karagenina. Prawdopodobny mechanizm działania związku MZO-2 może przebiegać przez wpływ na apoptozę lub blok w określonej fazie cyklu komórkowego. Związki o takim mechanizmie działania są opisane w literaturze [20-23]. Również hamowanie ekspresji kaspaz w komórkach Jurkat pozwala na zaproponowanie takiego mechanizmu działania, ponieważ kaspazy są niezbędne do wytwarzania interleukiny 2 (IL-2) po aktywacji komórek [24]. Ponadto aktywacja NF- $\kappa$ B, indukowana przez sieciowanie receptora komórki T i wynikającą z tego produkcją IL-2 jest także zależna od kaskady kaspaz [25]. Zarówno nadwrażliwość typu opóźnionego, w tym wrażliwość kontaktowa, które są zależne od swoistych antygenowo i zależnych od IL-2 komórek pomocniczych limfocytów T, subpopulacji komórek Th1, a także hamowanie w sposób pośredni wydzielania IL-2 przez MZO-2 dostarcza dodatkowych informacji na temat jego immunosupresyjnego działania. Opisywana pochodna może być bardzo skutecznym związkiem o działaniu przeciwzapalnym. **Analizując zależności pomiędzy strukturą a aktywnością opisywanej grupy związków wnioskowałem, że spośród trzech grup pochodnych izoksazolu układ monocykliczny jest najbardziej aktywny. Biorąc pod uwagę charakter podstawników w pierścieniu fenylowym, zauważyłem największy wpływ dwóch dużych grup metoksyowych na aktywność biologiczną w opisywanych przypadkach.**

Dodatkowym wynikiem przeprowadzonych badań opisanych w publikacji (H3) jest także zgłoszenie patentowe nr P.412380 zgłoszone w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej na wynalazek pt.: 2,4-dimetoksybenzyloamid kwasu 5-(1-etoksyetylidenoamino)-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego o aktywności immunomodulującej i przeciwzapalnej, sposób jego wytworzenia”.

Na podstawie analizy swoich wcześniejszych badań wytypowałem spośród aktywnych biologicznie tiosemikarbazydów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego dwa

związki do dalszych, szczegółowych badań biologicznych [26-29] (H4). Wytypowane pochodne to: 2-(5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbonylo)-*N*-fenylohydrazyno-1-karbotioamid (01K), 2-(5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbonylo)-*N*-(4-chlorofenylo)-hydrazyno-1-karbotioamid (06K) (Rys. 6). Jako punkt odniesienia podczas określania wpływu modyfikacji strukturalnych na aktywność do badań użyto wyjściowego 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohydrazynu (HIX).



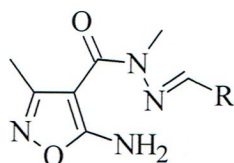
Rys. 6 Struktura aktywnych pochodnych tiosemikarbazydowych oraz HIX

Określono immunotropowe właściwości związków 01K i 06K w spontanicznej i indukowanej mitogenem konkanawaliną A – (ConA) oraz LPS proliferacji limfocytów u młodych (3 miesiące) jak i starszych myszach (13 miesięcy), produkcję cytokin przez komórki otrzewnowe oraz zaproponowano mechanizm działania w modelu z komórkami Jurkat. W przeprowadzonych badaniach 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohydrazyn okazał się nietoksyczny (linia J774E1, D10.G4.1, 3T3) oraz wykazał działanie stymulujące zarówno na spontaniczną, jak i indukowaną mitogenem proliferację limfocytów i produkcję interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Związki 01K i 06K także nie wykazały cytotoksyczności w zastosowanych dawkach i w opisanych modelach (linia J774E1, D10.G4.1, 3T3). Przeprowadzone badania pokazały, że aktywność immunoregulatorowa związków 01K i 06K była inna niż wyjściowego 5-amino-3-metylo-1,2-oxazolo-4-karbohydrazynu. **W testach proliferacyjnych 01K wykazał działanie regulujące podczas gdy 06K był supresorem w opisywanych modelach.** Wpływ 01K na produkcję cytokin był słaby w porównaniu do 06K, który bardzo silnie hamował produkcję IL-1 $\beta$  w małych dawkach (1 i 10  $\mu$ g/ml) oraz umiarkowanie lepiej hamował produkcję TNF- $\alpha$  w większej dawce (100  $\mu$ g/ml). **Silny antyproliferacyjny efekt 06K jest zgodny z danymi literaturowymi, które potwierdzają rolę**

**IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  w indukowanej mitogenem proliferacji komórek T oraz fakt, że IL-1 $\beta$  bardziej niż TNF- $\alpha$  wpływa na proliferację komórek T [30].** Zarówno 01K jak i 06K w wyższych dawkach wykazują hamujący efekt w modelu indukowanej Con-A proliferacji tymocytów. Supresyjną aktywność związku 06K w testach proliferacyjnych można wyjaśnić poprzez wzrost liczby komórek T [29], a także wydaje się możliwe, że 06K hamuje MAP-kinazę p38 warunkującą indukowaną mitogenem proliferację limfocytów [31]. Związek 01K wykazał znaczącą aktywność stymulującą u starszych ale nie u młodych myszy w modelu indukowanej LPS proliferacji splenocytów mysich (proliferaacji ulegają komórki B). **Takie właściwości związku 01K mogą mieć terapeutyczne znaczenie u pacjentów w podeszłym wieku poprzez wzmacnianie humoralnej odpowiedzi immunologicznej.** W modelu indukowanej konkanawaliną A proliferacji komórek T związek 01K wykazał działanie hamujące zarówno u młodych jak i starszych myszy. Wyniki takie można uznać za korzystne biorąc pod uwagę zwiększone poziomy autoreaktywnych komórek T u osób starszych [32].

Analizując zależność pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną można stwierdzić, że różnice w działaniu związków 01K (zawiera niepodstawiony pierścień fenylowy) i 06K mogą wynikać z obecności silnie elektronoakceptorowego podstawnika 4-chlorofenyłowego w pochodnej 06K. Obecność takiego podstawnika może mieć wpływ na silną aktywność supresyjną związku poprzez dużą interakcję z miejscem wiążącym bądź z receptorem [33]. Porównując różnice w działaniu związków 01K i 06K na ekspresję białek sygnałowych w komórkach Jurkat można zauważyć, że związek 01K podnosił ekspresję kaspazy 3, 9, Fas i Bcl2, podczas gdy związek 06K nie wpływał na poziom ekspresji kaspazę 3 i Fas, a działał na kaspazę 9 i Bcl2. **Można stwierdzić, że 01K wpływa na ekspresję wszystkich badanych białek sygnałowych wpływających na apoptozę [34].** Z kolei, całkowite hamowanie ekspresji kaspazy 3 przez 06K w komórkach Jurkat sugeruje antyproliferacyjną aktywność w indukowanej mitogenem proliferacji limfocytów wynikającą z niemożności produkcji IL-2 niezbędnej do podziału komórek [24]. Dodatkowo hamowanie Bcl2 może wpływać na hamowanie apoptozy indukowanej Fas [35] i zależna od kaspazy 9 apoptoza może nie być blokowana przez specyficzny dla kaspaz inhibitor [36]. **Przeprowadzone badania pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że związek 06K może używać innej drogi sygnałowej niż 01K, który nie wpływa na apoptozę (H4).**

Kontynuując badania zsyntezowałem nową serię *N'*-podstawionych pochodnych 5-amino-*N*,3-dimetyloizoksazolo-4-karbohidrazynu – MM1-10 (Rys. 7) (**H5**). Serię związków MM1-10 otrzymałem w reakcji 5-amino-*N*,3-dimetyloizoksazolo-4-karbohidrazynu z wybranymi związkami karbonyłowymi, w obecności katalitycznych ilości trifluorometanosulfonianu indu(III), w reakcji addycji nukleofilowej pierwszorzędowej grupy aminowej (terminalna grupa aminowa w pozycji 4 izoksazolu) z odpowiednim aldehydem. Grupa aminowa w pozycji 5 opisywanego układu izoksazolu była niereaktywna w zastosowanych warunkach reakcji. Jako produkty otrzymano *N'*-podstawione pochodne iminowe MM1-10. Struktury otrzymanych związków potwierdzono badaniami spektroskopowymi.



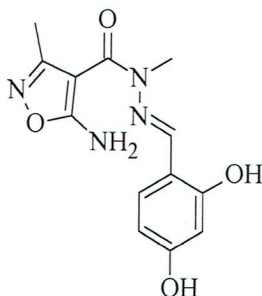
Rys. 7 Wzór strukturalny serii pochodnych MM1-10

Dla omawianych pochodnych zostały wykonane wstępne badania *in vitro* w kierunku aktywności immunomodulującej z użyciem ludzkich komórek krwi. **Związki MM1-10 charakteryzowały się zależną od dawki zdolnością do hamowania proliferacji PBMC indukowanej PHA.**

Sprawdzono również cytotoksyczne działanie otrzymanej serii związków MM1-10 na hodowle komórkowe referencyjnej linii A549. Badane pochodne wykazywały zróżnicowaną cytotoksyczność, zależną od zastosowanej dawki. 5-amino-*N'*-[5-(nitrotiofen-2-ylo)metylideno]-*N*,3-dimetyloizoksazolo-4-karbohidrazyn (MM4) wykazał bardzo dużą cytotoksyczność wobec linii A549 już w dawce 3  $\mu$ M, ale w pilotażowych badaniach indukowanej konkanawaliną A proliferacji splenocytów mysich wykazał dużą aktywność biologiczną. Z kolei we wstępnych badaniach wobec linii nowotworowej jelita grubego HT-29 (dane niepublikowane) tylko związek MM4 wykazał aktywność cytotoksyczną, spośród całej serii związków MM1-10, dlatego obecnie trwają badania mające na celu wyjaśnienie jego mechanizmu działania.

**Spośród badanych związków 5-amino-*N'*-[(2,4-dihydroksyfenylo)metylideno]-*N*,3-dimetyloizoksazolo-4-karbohidrazyn (MM3) (Rys. 8) prezentował najsilniejsze działanie**

**antyproliferacyjne, w określonych stężeniach silniejsze od leku referencyjnego Leflunomidu.** Ze względu na prezentowaną aktywność biologiczną oraz brak toksyczności MM3 został wytypowany do dalszych badań biologicznych.



Rys. 8 Wzór strukturalny aktywnej pochodnej MM3

Związek MM3 hamował indukowanej LPS produkcję TNF- $\alpha$  w hodowlach ludzkich komórkach krwi obwodowej. Określono podstawy molekularne immunosupresyjnej aktywności związku MM3 przy użyciu komórek Jurkat. MM3 wywoływał silny wzrost ekspresji białek sygnałowych w komórkach Jurkat (kaspaz, Fas, NF- $\kappa$ B1), które mogą wskazywać, że działanie proapoptotyczne może odpowiadać za właściwości immunosupresyjne pochodnej MM3 w badanych modelach *in vitro*. Przeprowadzone pilotażowe badania pokazały, że związki MM2 (zawiera grupę 4-hydroksyfenylową), MM3 (zawierającej ugrupowanie 2,4-dihydroksyfenylowe), MM6 (zawiera ugrupowanie 4-chlorofenyłowe) i MM7 (posiada grupę 2-chlorofenyłową) hamują w różnych dawkach indukowaną Con-A proliferację splenocytów mysich. Najaktywniejszy w tym modelu był MM3, który również był najsilniej hamującym związkiem w modelu indukowanej PHA proliferacji, ponadto nie wykazywał działania toksycznego wobec linii referencyjnej A549 (linia ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca) w stężeniu do 250  $\mu$ M. MM3 hamował również w sposób zależny od dawki produkcję TNF- $\alpha$  w hodowlach komórek krwi ludzkiej. 40% hamowania produkcji TNF- $\alpha$  występowała już w dawce 6.25  $\mu$ M. Wnioskując można stwierdzić, że MM3 wykazuje umiarkowane hamowanie proliferacji oraz silne, zależne od dawki hamowanie produkcji TNF- $\alpha$ . MM3 wywoływał silne działanie stymulujące na ekspresję kaspaz, NF- $\kappa$ B1 i białek sygnałowych Fas w komórkach Jurkat. Nie wpływał natomiast na ekspresję białka p53 oraz słabo na białko Bcl-2. **Badania nad mechanizmem działania pochodnej MM3 ujawniły pewne podobieństwa do działania związku 01K [37] wskazującego indukowanie apoptozy**

komórek jako głównej przyczyny właściwości immunosupresyjnych MM3. **Wyniki zdecydowanie sugerują inicjację przez MM3 szlaku proapoptotycznego związanego z aktywacją przez kaspazę 8 - czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B1 [38] i Fas [39]. Z kolei opierając się na danych literaturowych udział Bcl-2 [40] i p53 [41] w tym procesie wydaje się być wykluczony.**

**Analizując zależność pomiędzy strukturą a aktywnością farmakologiczną w grupie pochodnych MM1-10 mogę stwierdzić, że na opisywaną aktywność pochodnej MM3 prawdopodobnie wpływa obecność dwóch grup hydroksylowych w pierścieniu fenylowym. W teorii zwiększyło to polarność cząsteczki i możliwość tworzenia większej liczby wiązań wodorowych.**

Reasumując, dotychczasowe badania związku MM3, skutkowały zaproponowaniem molekularnego mechanizmu jego działania, dlatego wytypowałem go do kolejnych badań w modelach *in vivo* celem określenia jego potencjalnej wartości terapeutycznej (H5).

Podsumowaniem przedstawionego planu badawczego było opracowanie studium literaturowego poświęconego usystematyzowaniu aktualnej wiedzy o pochodnych izoksazolu, wykazujących działanie na układ immunologiczny, a także przedstawieniu pozycji swoich badań na tle literatury światowej nad niskocząsteczkowymi i aktywnymi immunologicznie pochodnymi izoksazolu. Praca przedstawia opublikowane dane dzieląc pochodne izoksazolu na cztery grupy w zależności od sposobu działania na układ immunologiczny: immunosupresyjnie, immunostymulująco, przeciwzapalnie oraz immunoregulująco. W możliwych przypadkach przedstawiony został prawdopodobny mechanizm działania związków i ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Szczególna uwaga została poświęcona związkom immunostymulującym oraz ich potencjalnym zastosowaniom u pacjentów onkologicznych (H7).

## **Podsumowanie**

Podsumowując mogę stwierdzić, że prezentowane osiągnięcie naukowe stanowi przykład kompleksowego postępowania w poszukiwaniu nowych leków. Wyniki przeprowadzonych badań poszerzyły stan wiedzy w zakresie syntezy nowych leków immunomodulujących w grupie pochodnych izoksazolu.



Założone cele badawcze zostały osiągnięte. Zsyntezowałem wiele nowych pochodnych izoksazolu, których strukturę oraz czystość potwierdziłem poprzez analizę danych spektroskopowych (magnetyczny rezonans jądrowy  $^1\text{H}$ NMR i  $^{13}\text{C}$ NMR, spektroskopia w podczerwieni, rentgenografia strukturalna, analiza elementarna oraz spektrometria mas).

Dla wszystkich otrzymanych pochodnych określono cytotoksyczność oraz aktywność immunologiczną w oparciu o wykonane modele doświadczalne. Wszystkie opisane w pracach związki były nietoksyczne oraz wykazały pożądaną aktywność farmakologiczną. Każda z nowo otrzymanych pochodnych powiększyła bazę struktur, która może być wykorzystana przy tworzeniu modeli ułatwiających poszukiwania nowych substancji o zdefiniowanych właściwościach.

W każdej grupie związków przeprowadziłem analizę zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną otrzymanych związków. Ujawniłem szereg zależności, które w znaczący sposób mogą ukierunkować projektowanie nowych leków stosowanych w zaburzeniach immunologicznych.

Analizując otrzymane wyniki wytypowałem najaktywniejsze pochodne w celu wykonania dodatkowych badań biologicznych oraz poszukiwania ich mechanizmu działania na układ immunologiczny. Wyniki tych badań potwierdziły bardzo dużą aktywność immunomodulującą przy braku toksyczności, a także pozwoliły na zaproponowanie prawdopodobnego mechanizmu działania związków oraz wskazanie potencjalnego zastosowania terapeutycznego.

Po wnikliwej analizie wszystkich wyników badań stwierdzam, że układ izoksazolu odgrywa istotną rolę w oddziaływaniu na układ immunologiczny i jego pochodne stanowią grupę potencjalnych immunosupresorów, immunostymulatorów czy immunoregulatorów.

Reasumując, przeprowadzone badania chemiczno-farmakologiczne i wynikające z nich wnioski pozwoliły na zaproponowanie nowych struktur wiodących w grupie pochodnych izoksazolu o działaniu na układ immunologiczny.

## D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### Osiągnięcia naukowo-badawcze uzyskane przed otrzymaniem stopnia naukowego doktora.

W roku 1999 ukończyłem studia na Wydziale Farmaceutycznym z OAM Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu rozpocząłem 1 października 1999 roku na stanowisku asystenta. Od pierwszych dni aktywnie włączyłem się w pracę badawczą jednostki. Moje zainteresowania dotyczyły głównie syntezy małowczątkowych pochodnych izoksazolu i izotiazolu o potencjalnej aktywności biologicznej. Analizując dane literaturowe dotyczące aktywności biologicznej izoksazolu i izotiazolu stwierdziłem, że skieruję swoje badania w kierunku pochodnych izoksazolu, które wykazują aktywność na układ immunologiczny nie wykazując przy tym działania toksycznego. Rozpocząłem współpracę z prof. dr hab. Michałem Zimeckim z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu (współpraca z Panem profesorem trwa nieprzerwanie do dnia dzisiejszego) oraz prof. dr hab. Aleksandrem Kollem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stworzenie interdyscyplinarnego zespołu umożliwiło przeprowadzenia pełnego zakresu badań obejmującego syntezę związków, badania biologiczne oraz obliczenia kwantowo-chemiczne. Badania te były koordynowane przez mojego opiekuna naukowego, wówczas Pana dr Stanisława Rynga.

Moje pierwsze zadania naukowe rozpocząłem od syntezy pochodnych izoksazolu, a w szczególności pochodnych kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyłowego oraz analizy danych spektralnych otrzymanych związków. W tym okresie opracowałem wydajne metody syntezy *N*'-podstawionych hydrazydów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyłowego, 5-podstawionych pochodnych 3-metyloizoksazolo[5,4-*d*]1,2,3-triazyn-4-onu, 5-podstawionych pochodnych 3-metyloizoksazolo[5,4-*d*]pirymidyn-4-onu oraz podstawionych semikarbazydów i tiosemikarbazydów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyłowego. Syntetyzowane pochodne przekazywałem do badań biologicznych w kierunku aktywności immunomodulującej w wielu modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie otrzymanych wyników dokonałem analizy zależności pomiędzy strukturą a aktywnością immunomodulującą. Pierwsze trzy grupy związków wykazały aktywność immunosupresyjną podczas gdy podstawione semikarbazydy i tiosemikarbazydy kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-

4-karboksylowego wykazały zależną od rodzaju podstawnika i obecności ugrupowania semikarbazydowego lub tiosemikarbazydowego, a także zastosowanej dawki, aktywność immunosupresyjną oraz immunostymulującą.

Opisane powyżej badania zostały wykonane w ramach następujących projektów badawczych:

1. „Synteza, własności fizykochemiczne i biologiczne nowych pochodnych izoksazolu i izoksazolo[5,4-*d*]pirymidyny o oczekiwanej aktywności immunomodulującej”, grant nr 730, Akademia Medyczna we Wrocławiu 1999 - 2002, **Marcin Mączyński - wykonawca grantu.**
2. „Synteza nowych 5-podstawionych pochodnych 3-metyloizoksazolo[5,4-*d*]1,2,3-triazyn-4-onu – nowej struktury wiodącej o potencjalnej aktywności immunomodulującej oraz przeciwnowotworowej”, grant nr 433, Akademia Medyczna we Wrocławiu 2002 - 2004, **Marcin Mączyński - kierownik grantu.**
3. „Synteza nowych dwupodstawionych semitiokarbazydów i semikarbazydów pochodnych izoksazolu – nowych struktur o potencjalnej aktywności immunomodulującej”, grant nr 1312, Akademia Medyczna we Wrocławiu 2005 - 2007, **Marcin Mączyński - kierownik grantu.**

Wyniki badań będących realizacją pierwszych 3 projektów badawczych opublikowałem w 4 pracach oryginalnych [42-45] oraz przedstawiłem w formie 8 posterów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (dane zawarte w wykazie dorobku naukowego, załącznik nr 4).

Będąc członkiem interdyscyplinarnego zespołu badawczego przeprowadziłem syntezę nowych pochodnych izoksazolu, zoptymalizowałem metody syntezy oraz potwierdziłem struktury chemiczne i czystość związków poprzez interpretację danych spektroskopowych. Nasz zespół badawczy przeprowadził szczegółowe i selektywne badania farmakologiczne otrzymanych pochodnych izoksazolu określając ich wartość terapeutyczną. Wynikiem przeprowadzonych badań były dwie prace oryginalne dotyczące wpływu związku 3,5,7-trimetylo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-izoksazolo[5,4-*e*][1,2,4]triazepin-4-onu (RM-33) na odpowiedź immunologiczną [16, 46].

Powyższe badania wykonałem realizując grant:

4. „Synteza, badania biologiczne, strukturalne i kwantowo-chemiczne nowych związków pochodnych izoksazolu o oczekiwanej aktywności immunomodulującej”, grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 3P05F01224, 2003 – 2006, **Marcin Mączyński - wykonawca grantu.**

Jestem również współautorem opracowania teoretycznego, monografii w podręczniku, dotyczącego historii odkrycia i pierwszego zastosowania penicyliny [47].

Ośmioletnie badania dotyczące syntezy, analizy danych spektralnych, badań biologicznych oraz analizy zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością farmakologiczną pochodnych izoksazolu zostały uwieńczone w 2007 **uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych na podstawie rozprawy doktorskiej „Synteza i aktywność immunomodulująca nowych pochodnych izoksazolu”** wykonanej pod kierunkiem, wówczas, Pana dr hab. Stanisława Rynga.

**Efektom mojej aktywności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych było współautorstwo w 6 publikacjach oryginalnych i 1 rozdziale w monografii. Sumaryczny impact factor (IF) wynosi 3.725, punktacja MNiSW/KBN = 51 (45 pkt. za publikacje + 6 pkt. za rozdział w monografii).**

**Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze uzyskane po otrzymaniu stopnia naukowego doktora.**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych moje zainteresowania naukowe uległy rozwinięciu. Oprócz zasadniczego kierunku badawczego, stanowiącego podstawę habilitacji, tj. syntezy nowych pochodnych izoksazolu o potencjalnej aktywności immunomodulującej, kontynuowałem tematykę badawczą dotyczącą zarówno syntezy pochodnych izoksazolu oraz izotiazolu, a także oceny ich aktywności biologicznej celem poszukiwania nowych zastosowań terapeutycznych. Rozwijając swoje zainteresowania naukowe w grupie pochodnych azoli poszerzyłem badania o układ 1,3-oksazolu. Otrzymane pochodne po wstępnych badaniach biologicznych wykazały interesującą aktywność na układ

immunologiczny (dane niepublikowane, przygotowywane jest zgłoszenie patentowe i manuskrypt oraz trwają dodatkowe badania farmakologiczne).

Mając na uwadze korzystne właściwości biologiczne zsyntezowanych przeze mnie opisanych wcześniej podstawionych semikarbazydów i tiosemikarbazydów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyowego przeprowadzone zostały dodatkowe badania farmakologiczne (współpraca z prof. Michałem Zimeckim z IITD PAN we Wrocławiu, z Panią prof. dr hab. Bożeną Obmińską-Mrukowicz i Panią dr Angeliką Sysak (wcześniej Drynda) z Katedry Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu) oraz obliczenia kwantowo-chemiczne (współpraca z Panem prof. Aleksandrem Kollem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego). Otrzymane przeze mnie pochodne izoksazolu poddała badaniom farmakologicznym, realizując swoją pracę doktorską Pani mgr Angelika Sysak. Przeprowadzone badania biologiczne sprofilowały jej zakres badawczy i stanowiły część jej pracy doktorskiej, którą autorka obroniła. Spośród wymienionych pochodnych tiosemikarbazydowych dwa związki: 3-(5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbonylo)-*N*-butylotriaz-2-eno-1-karbotioamid (M3) oraz 3-(5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbonylo)-*N*-(prop-2-en-1-ylotriaz-2-eno-1-karbotioamid (M4) wykazały znaczącą statystycznie i zależną od dawki aktywność immunostymulującą w opisanym modelu indukowanej konkanawaliną A proliferacji splenocytów mysich *in vitro*. Zaskakujące okazało się to, że te same związki M3 i M4 w modelu wtórnej humoralnej odpowiedzi immunologicznej splenocytów mysich używając erytrocytów barana okazały się silnymi immunosupresorami. Badania pokazały, że te same związki mogą być immunosupresorami w modelach humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz immunostymulatorami w modelu indukowanej mitogenem proliferacji limfocytów T. Taka sama zależność była stwierdzona w otrzymanej w naszym zespole i opisaną wyżej pochodnej izoksazolotriazepiny – związku RM33 oraz znanym leku immunosupresyjnym Leflunomidzie. Z kolei analizując zależność struktura-aktywność stwierdziłem, że opisywane pochodne jako jedyne z całej serii związków posiadały podstawnik alifatyczny (butylowy lub prop-2-en-1-ylowy) i ugrupowanie tiosemikarbazydowe, co prawdopodobnie warunkowało ich aktywność immunomodulującą [26]. Otrzymane wyniki badań skłoniły mnie do przeprowadzenia kolejnych badań biologicznych oraz obliczeniowych w tej samej grupie podstawionych semikarbazydów i tiosemikarbazydów kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksyowego. Poszerzenie profilu badawczego o nowe modele doświadczalne nie spowodowało wysunięcia nowych wniosków oraz

zaproprowania innych zastosowań terapeutycznych w tej grupie związków [27]. W trakcie swoich badań zajmowałem się także syntezą oraz optymalizacją metod syntezy otrzymanych wcześniej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pochodnych izoksazolu, które w podstawowych badaniach wykazały znaczącą aktywność immunomodulującą i brak toksyczności w zastosowanych stężeniach. Otrzymane pochodne były poddane dodatkowym badaniom farmakologicznym w różnych modelach doświadczalnych celem określenia ich przydatności terapeutycznej.

Wyniki przedstawionych powyżej interdyscyplinarnych badań zostały opublikowane w 6 artykułach, których jestem współautorem [28, 29, 48-51].

Opisane powyżej badania zostały wykonane w ramach następujących projektów badawczych:

1. „Synteza nowych pochodnych 1,2,4-triazolo-, 1,3,4-tiadiazolo- izoksazolu o spodziewanej aktywności immunomodulującej”, grant nr 1781, Akademia Medyczna we Wrocławiu 2008 - 2009, **Marcin Mączyński - kierownik grantu.**
2. „Synteza i badania biologiczne nowych pochodnych izoksazolu o spodziewanych właściwościach immunorestytucyjnych”, grant nr N N405 682840, Narodowe Centrum Nauki 2011 - 2014, **Marcin Mączyński - wykonawca grantu.**
3. Badania Statutowe realizowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, od 2008 do 2018 roku **Marcin Mączyński - wykonawca zadania**, od 2018 roku **Marcin Mączyński - kierownik zadania.**

Kolejnym celem naukowym były badania prowadzące do wyjaśnienia braku reaktywności pierwszorzędowej grupy aminowej w 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohydrydzie i jego pochodnych. We współpracy z dr Andrzejem Regiecem z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, prof. dr hab. Adamem Pietraszko z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN we Wrocławiu oraz dr Piotrem Wojciechowskim z Politechniki Wrocławskiej szczegółowo opisaliśmy zależności występujące w opisywanym związku. Wyciągnięte wnioski dały odpowiedzi na pytania sformułowane w celu pracy. Opisywana grupa

aminowa w 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohidrazydzie zachowuje się jak grupa iminowa (drugorzędowa), co uniemożliwia wykonanie reakcji z reagentami nukleofilowymi [15].

Rozwijając swoje zainteresowania naukowe poszukiwaliśmy nowych zastosowań terapeutycznych dla zsyntezowanych przeze mnie i dr Paulinę Płoszaj 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohidrazydu oraz 5-amino-3-metyloizoksazolo[5,4-*d*]pirymidyn-4-onu i jego pochodnych. Przeglądając dane literaturowe stwierdziliśmy, że otrzymane pochodne mogą posiadać aktywność przeciwgruźliczą ponieważ opisywany 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohidrazyd i jego pochodne można uznać za analogi strukturalne leku przeciwgruźliczego Isoniazydu. We współpracy z naukowcami z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wykonano badania przeciwpłatkowe 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karbohidrazydu i jego pochodnych. Otrzymane wyniki potwierdziły aktywność przeciwpłatkową przy braku toksyczności w zastosowanych dawkach, dlatego zasadna wydaje się kontynuacja rozpoczętych badań celem poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwgruźliczym [52].

Razem we współpracy z Panią dr Urszulą Lipnicką z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, która zajmowała się syntezą pochodnych izotiazolu otrzymaliśmy pochodne estru etylowego kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego zostały poddane badaniom farmakologicznym (w kierunku aktywności na układ immunologiczny oraz przeciwnowotworowej). Otrzymane pochodne nie wykazały aktywności przeciwnowotworowej (dane niepublikowane), a aktywność w kierunku układu immunologicznego była umiarkowana. Wyniki z tych badań zostały opublikowane w roku 2009 [53]. Przeglądając dane literaturowe stwierdziłem, że istnieją informacje na temat pochodnych izotiazolu o aktywności przeciwnowotworowej. Nowotwory wciąż stanowią istotny problem społeczny stąd poszukiwanie leków przeciwnowotworowych jest bardzo ważnym kierunkiem badań. Badania rozpoczęła, realizując studia doktoranckie, Pani mgr farm. Izabela Jęskowiak (promotor pracy - prof. dr hab. Stanisław Ryng, **promotor pomocniczy – dr Marcin Mączyński**). Analizując swoje wcześniejsze badania nad pochodnymi estru etylowego kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego zasugerowałem Doktorantce syntezę nowych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego. Niska wydajność reakcji, brak powtarzalności procesów oraz problemy z czystością produktów finalnych skłoniła nas do optymalizacji metod syntezy opisywanych pochodnych. Doktorantka wykonała syntezę ponad 30 nowych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego, które zostały

przekazane do badań w kierunku aktywności przeciwnowotworowej (współpraca z Panią prof. dr hab. Joanną Wietrzyk z IITD PAN we Wrocławiu). Wyniki są niezwykle interesujące i obiecujące, obecnie trwa ich interpretacja oraz przygotowany jest manuskrypt.

Efektem mojej aktywności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych było współautorstwo w **19 publikacjach** (18 oryginalnych i 1 opracowaniu teoretycznym). **Sumaryczny impact factor (IF) za publikacje wynosi 26.849, punktacja za publikacje MNiSW/KBN = 351.** Wyniki zostały przedstawione w formie **39 komunikatów posterowych** na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (dane zawarte w wykazie dorobku naukowego, załącznik nr 4).

Podsumowując, **efekt całej mojej aktywności naukowo-badawczej w latach 1999 - 2018 stanowi współautorstwo w 25 publikacjach** (24 oryginalnych i 1 opracowaniu teoretycznym), **współautorstwo 1 rozdziału w monografii, 1 udzielony patent oraz 1 zgłoszenie patentowe.** Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie **47 komunikatów posterowych** na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. W latach 2008 - 2016 wykonałem **9 recenzji** artykułów naukowych. **Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) za publikacje wynosi 30.124, punktacja za publikacje MNiSW/KBN = 396, punktacja za rozdział w monografii MNiSW/KBN = 6, indeks Hirscha wynosi 8, całkowita liczba cytowań 158, bez autocytowań 74** (wg bazy Web of Science, 2018.12.12).

Oprócz aktywności naukowej **jestem zaangażowany w działalność dydaktyczną** Katedry i Zakładu Chemii Organicznej oraz Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Prowadzę zajęcia dydaktyczne w ramach pensum dydaktycznego z chemii organicznej w następujących formach:  
wykłady dla studentów farmacji (od 1.10.2018 roku stale, wcześniej zastępstwa),  
ćwiczenia laboratoryjne dla studentów farmacji (od 1999 roku do obecnie) i analityki medycznej (w latach 1999-2012).

Jestem współautorem skryptu dla studentów Farmacji „*Preparatyka organiczna*” pod redakcją prof. dr hab. Stanisława Rynga (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, 2014).



Brałem czynny udział w pracach Rady Programowej na kierunku „Farmacja” w latach 2014/2015 oraz 2015/2016.

W trakcie mojej pracy dydaktycznej byłem promotorem 12 prac magisterskich wykonanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz recenzentem 15 prac magisterskich wykonanych na Wydziale Farmaceutycznym z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Uhonorowaniem mojej działalności dydaktycznej było otrzymanie Dyplomu za zajęcie I miejsca w kategorii Asystent w plebiscyie „Mój wymarzony.....2015 roku”. Konkurs został przeprowadzony przez Sekcję Studencką Wrocławskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Młoda Farmacja”, Wrocław 2015r.

**Moje zaangażowanie w pracę organizacyjną** na rzecz Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu obejmowało pracę w strukturach Uczelni oraz Wydziału Farmaceutycznego. Potwierdza to lista aktywności znajdująca się poniżej:

1. Członek Senatu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2016 - 2020
2. Członek Senackiej Komisji Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2016 - 2020
3. Członek i zastępca przewodniczącego Senackiej Komisji Odznaczeń Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2016 - 2020
4. Członek Senackiej Komisji Arbitrażowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2016 - 2020
5. Członek zespołu opracowującego nowy Statut Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu zgodnie z Ustawą 2.0, 2018 - 2019
6. Członek Rektorskiej Komisji Antymobbingowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2018 - 2019
7. Członek Wydziałowego Zespołu ds. przygotowania dokumentacji akredytacyjnej, Wydział Farmaceutyczny z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2017
8. Członek Wydziałowej Komisji ds. Nostryfikacji Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2016 - 2020

9. Członek Rektorskiej Komisji ds. Wynalazczości Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2005 – 2008, 2008 – 2012, 2012 – 2016
10. Członek Wydziałowej Komisji ds. doktoratów *honoris causa* Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2012 - 2016
11. Członek Rady Wydziału Farmaceutycznego z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2012 – 2016 oraz Akademii Medycznej we Wrocławiu w latach 2005 - 2007
12. Członek Uczelnianego Kolegium Elektorów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2008 - 2012, 2012 - 2016
13. Członek Zespołu Koordynującego wyposażenie „Nowej Farmacji” Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2011 - 2013
14. Członek Komitetu Organizacyjnego obchodów 60-lecia Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2010
15. Elektor Akademii Medycznej we Wrocławiu do Rady Głównej Szkolnictwa Wyższego na X kadencję, 2010
16. Członek Rektorskiej Komisji ds. Promocji Uczelni Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2008 - 2012
17. Członek Rektorskiej Komisji Dyscyplinarnej ds. Doktorantów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 2008 - 2012
18. Członek Wydziałowej Komisji Wyborczej Wydziału Farmaceutycznego z OAM Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2008 - 2012
19. Opiekun studentów podczas 6-cio miesięcznej praktyki w aptekach po ukończeniu V roku Farmacji na Wydziale Farmaceutycznym z OAM Akademii Medycznej we Wrocławiu powołany przez Prorektora ds. Dydaktyki Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2007 - 2012
20. Członek Wydziałowej Komisji Konkursowej ds. pierwszego zatrudnienia na stanowiska kierowników katedr, zakładów i samodzielnych pracowni na Wydziale Farmaceutycznym z OAM Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2005 - 2008
21. Przewodniczący Rady Mieszkańców Hotelu Asystenta Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2004 - 2005
22. Zastępca Przewodniczącego Rady Mieszkańców Hotelu Asystenta Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2002 - 2003

**Moja aktywność obejmuje także udział w komitetach organizacyjnych krajowych konferencji naukowych oraz w strukturach Dolnośląskiego Samorządu Aptekarskiego jako:**

1. Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego ogólnopolskiego Sympozjum „Szkoła Chemii Medycznej”, Wrocław 2013, 2015, 2017.
2. Członek Komitetu Organizacyjnego XIX Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Wrocław 2004.
3. Członek Rady Aptekarskiej Dolnośląskiej Izby Aptekarskiej we Wrocławiu, 2015 – 2019.
4. Delegat Dolnośląskiej Izby Aptekarskiej na Zjazd Sprawozdawczo-Wyborczy, Rejon Wrocławski, 2011 – 2015, 2015 – 2019.
5. Członek Zarządu Wrocławskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, od 2016 roku - nadal.

**Jestem członkiem krajowych organizacji oraz towarzystw naukowych:**

- |  |         |
|--|---------|
| 1. Dolnośląska Izba Aptekarska                 | od 1999 |
| 2. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne (PTFarm) | od 1999 |
| 3. Ogólnopolska Sekcja Chemii Medycznej PTFarm | od 2001 |
| 4. Polskie Towarzystwo Chemii Medycznej        | od 2007 |

**Moja współpraca naukowa** z ośrodkami badawczymi została poparta publikacjami, a podjęte badania zyskały charakter interdyscyplinarny. **Jednostki naukowe z którymi współpracuję to:**

1. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
2. Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław
3. Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
4. Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław

5. Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
6. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Lekarski, Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka, Zakład Histologii i Embriologii, Ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław
7. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław
8. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Farmaceutyczny z OAM, Katedra i Zakład Toksykologii, ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław
9. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Farmaceutyczny z OAM, Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław

**Za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej, dydaktycznej oraz organizacyjnej zostały mi przyznane:**

- **Brązowy Krzyż Zasługi (3 stopnia)**, legitymacja nr 580-2016-32, Warszawa 6.12.2016, nadany postanowieniem Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Andrzeja Dudy.
- **Srebrna Odznaka Honorowa „Academia Medica Wratislaviensis”**, legitymacja 589, Wrocław 24.04.2012, nadaną uchwałą Senatu Akademii Medycznej we Wrocławiu.
- **9 Nagród Indywidualnych JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu:** 2007, 2008 dwie, 2009, 2010, 2011, 2015 dwie, 2017.
- **8 Nagród Zespołowych JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu:** 2004, 2005, 2007, 2009, 2010, 2012, 2015, 2016.

## 5. Piśmiennictwo

- [1] Fredericks S, Holt DW. Pharmacogenomics of immunosuppressive drug metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertend* 2003, 12, 607-13.
- [2] Kim M, Jung M, Hong SP, Jeon H, Kim MJ, Cho MY, Lee SH, Man MQ, Elias PM, Choi EH. Topical calcineurin inhibitors compromise stratum corneum integrity, epidermal permeability and antimicrobial barrier function. *Exp Dermatol* 2010, 19, 501-10.
- [3] Gutfreund K, Bienias W, Szewczyk A, Kaszuba A. Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. *Postępy Dermatol Alergol* 2013, 30, 165-9.
- [4] Lebranchu Y. Can we eliminate both calcineurin inhibitors and steroids? *Transplant Proc* 2010, 42, 9, 25-8.
- [5] Giomi D, Cordero FM, Machetti F. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katrizky AR, Ramsden CA, Scriven EFV, Taylor RJK, Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2008, pp. 365-486.
- [6] Barmade MA, Murumkar PR, Sharma MK, Yadav MR. Medicinal chemistry perspective of fused isoxazole derivatives. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, 16, 2863-2883.
- [7] Uto Y. 1, 2-Benzisoxazole: A privileged structure with a potential for polypharmacology. *Curr. Pharm. Des.* 2016, 22, 3201-3211.
- [8] Sysak A, Obmińska-Mrukowicz B. Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 137, 292-309.
- [9] Zhu J, Mo J, Lin HZ, Chen Y, Sun HP. The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 23, 3065-3075.
- [10] Michał Zimecki, Urszula Bąchor, Marcin Mączyński: Isoxazole derivatives as regulators of immune functions, *Molecules* 2018, 23, 10, 2724.
- [11] Herrmann ML, Schleyerbach R, Kirschbaum BJ. Leflunomide: An immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology* 2000, 47, 273-289.
- [12] Kremer JM. Methotrexate and leflunomide: Biochemical basis for combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 1999, 29, 14-26.
- [13] Furst DE. Innovative treatment approaches for rheumatoid arthritis. Cyclosporin, leflunomide and nitrogen mustard. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 1995, 9, 711-729.

- [14] Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1988 May 23, 232, 2, 347-350.
- [15] Andrzej Regiec, Piotr Wojciechowski, Adam Pietraszko, Marcin Mączyński: Infrared spectra and other properties predictions of 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarbohydrazide with electric field simulation using CPC model. *J.Mol.Struct.* 2018, 1161, 320-338.
- [16] Michał Zimecki, Stanisław Ryng, Marcin Mączyński, Grzegorz Chodaczek, Maja Kocięba, Jan Kuryszko, Katarzyna Kaleta: Immunosuppressory activity of an isoxazolo[5,4-*e*]triazepine-compound RM-33. II. Effects on the carrageenan-induced inflammation. *Pharmacol.Rep.* 2006, 58, 2, 236-241.
- [17] Plescia S, Daidone G, Raffa D, Bajardi ML, Caruso A, Cutuli V, Amico-Roxas M. Synthesis and pharmacological study of some 3-(isoxazol-5-yl)-quinazolin-4(3H)-ones. *Farmaco* 1992, 47, 465-75.
- [18] Huang WH, Yang CL, Lee AR, Chiu HF. Leflunomide analogues as potential antiinflammatory agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003, 51, 313-4.
- [19] Sawamukai N, Saito K, Yamaoka K, Nakayamada S, Ra C, Tanaka Y. Leflunomide inhibits PDK1/Akt pathway and induces apoptosis of human mast cells. *J Immunol* 2007, 179, 6479-84.
- [20] Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and apoptosis. *J Immunol* 2000, 165, 5962-9.
- [21] Liu T, Dong X, Xue N, Wu R, He Q, Yang B, Hu Y. Synthesis and biological evaluation of 3,4-diaryl-5-aminoisoxazole derivatives. *Bioorg Med Chem* 2009, 17, 6279-85.
- [22] Wyreńska A, Szymański J, Gach K, Piekielna J, Koszuk J, Janecki T, Janecka A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 2013, 40, 1655-63.
- [23] Theoclitou ME, Aquila B, Block MH, Brassil PJ, Castriotta L, Code E, et al. Discovery of (+)-N-(3-aminopropyl)-N-[1-(5-benzyl-3-methyl-4-oxo-[1,2]thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-6-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamide (AZD4877), a kinesin spindle protein inhibitor and potential anticancer agent. *J Med Chem.* 2011, 54, 6734-50.

- [24] Mukerjee N, McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK. Caspase-mediated calcineurin activation contributes to IL-2 release during T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 285, 1192-9.
- [25] Zhao Y, Lei M, Wang Z, Qiao G, Yang T, Zhang J. TCR-induced, PKC- $\theta$ -mediated NF- $\kappa$ B activation is regulated by a caspase-8-caspase-9-caspase-3 cascade. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 450, 526-31.
- [26] Marcin Mączyński, Michał Zimecki, Stanisław Ryng: A new class of isoxazole derivatives: The M 1-9 series of compounds with immunotropic activity. *Acta Pol.Pharm.* 2008, 65, 2, 241-244.
- [27] Marcin Mączyński, Michał Zimecki, Magdalena Taraszkiewicz, Stanisław Ryng: Synthesis, immunological activity and computational study of 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid semicarbazides and thiosemicarbazides. *Acta Pol.Pharm.* 2008, 65, 5, 543-549.
- [28] Angelika Drynda, Marcin Mączyński, Stanisław Ryng, Bożena Obmińska-Mrukowicz: *In vitro* immunomodulatory effects of 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid hydrazide on the cellular immune response *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 2014, 36, 2, 150-157.
- [29] Angelika Drynda, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Marcin Mączyński, Stanisław Ryng: The effect of 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid hydrazide on lymphocyte subsets and humoral immune response in SRBC-immunized mice *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 2015, 37, 2, 148-157.
- [30] R J Hackett, L S Davis and P E Lipsky, Comparative effects of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta on mitogen-induced T cell activation. *J Immunol* April 15, 1988, 140, 8, 2639-2644.
- [31] Laufer SA, Margutti S, Fritz MD, Substituted isoxazoles as potent inhibitors of p38 MAP kinase. *ChemMedChem.* 2006 Feb 1, 2, 197-207.
- [32] Weyand CM, Brandes JC, Schmidt D, Fulbright JW, Goronzy JJ, Functional properties of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev.* 1998 May 15, 102, 2-3, 131-47.
- [33] Mesaik MA, Rahat S, Khan KM, Zia-Ullah, Choudhary MI, Murad S, Ismail Z, Atta-ur-Rahman, Ahmad A, Synthesis and immunomodulatory properties of selected oxazolone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2004 May 1, 12, 9, 2049-57.

- [34] Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR, Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem.* 1999 Oct 22, 274, 43, 30651-6.
- [35] Kawahara A, Kobayashi T, Nagata S, Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene.* 1998 Nov 19, 17, 20, 2549-54.
- [36] Watanabe K, Kanno S, Tomizawa A, Yomogida S, Ishikawa M, Acacetin induces apoptosis in human T cell leukemia Jurkat cells via activation of a caspase cascade. *Oncol Rep.* 2012 Jan 27, 1, 204-9.
- [37] Angelika Drynda, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Ewa Zaczyńska, Michał Zimecki, Iwona Kochanowska, Stanisław Ryng, Marcin Mączyński: 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarboxylic acid hydrazide derivatives with in vitro immunomodulatory activities, *Chem.Biol Drug Des.* 2017, 89, 5, 705-713.
- [38] Chaudhary PM, Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Liu L, Hood L. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 2000, 19, 4451-4460.
- [39] Liu F, Bardhan K, Yang D, Thangaraju M, Ganapathy V, Waller JL, Liles GB, Lee JR, Liu K. NF- $\kappa$ B directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 25530-25540.
- [40] Mohan S, Abdelwahab SI, Kamalidehghan B, Syam S, May KS, Harmal NSM, Shafifiyaz N, Hadi AHA, Hashim NM, Rahmani M, Taha MME, Cheah S.C., Zajmi A. Involvement of NF- $\kappa$ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine* 2012, 19, 1007-1015.
- [41] Selter H, Montenarh M. The emerging picture of p53. *Int. J. Biochem.* 1994, 26, 145-154.
- [42] Marcin Mączyński, Aneta Jezierska, Michał Zimecki, Stanisław Ryng: Synthesis, immunological activity and theoretical study of new 5-substituted 3-methylisoxazole[5,4-*d*] 1,2,3-triazin-4-one derivatives. *Acta Pol.Pharm.* 2003, 60, 2, 147-150.
- [43] Marcin Mączyński, Michał Zimecki, Stanisław Ryng: Structure and immunological activity of disubstituted thiosemicarbazide isoxazole derivative. *Acta Pol.Pharm.* 2004, 61, 82-83.
- [44] Aneta Jezierska, Marcin Mączyński, Aleksander Koll, Stanisław Ryng: Structure/activity investigations of 5-substituted 3-methylisoxazole[5,4-*d*]1,2,3-triazin-4-one derivatives. *Arch.Pharm.* 2004, 337, 2, 81-89.



- [45] Marcin Mączyński, Michał Zimecki, Ewa Drozd-Szczygieł, Stanisław Ryng: The synthesis, physicochemical properties and immunological activity of 5-amino-3-methylisoxazolo[5,4-d]4-pyrimidinone derivatives. *Cell.Mol.Biol.Lett.* 2005, 10, 4, 613-623.
- [46] Stanisław Ryng, Michał Zimecki, Marcin Mączyński, Grzegorz Chodaczek, Maja Kocięba: Immunosuppressive activity of an isoxazolo[5,4-e]triazepine - compound RM33. I. Effects on the humoral and cellular immune response in mice. *Pharmacol.Rep.* 2005, 57, 2, 195-202.
- [47] Katarzyna Mączyńska, Marcin Mączyński: Penicyliny. Historia odkrycia i pierwsze zastosowanie W: Leczyć, uzdrowić, pomagać; pod red. Bożeny Płonki-Syroki, Andrzeja Syroki; Wrocław: Wydaw. Arboretum, 2007, 265-282. (Studia z Dziejów Kultury Medycznej; T.11)
- [48] Michał Zimecki, Marcin Mączyński, Jolanta Artym, Stanisław Ryng: Closely related isoxazoles may exhibit opposite immunological activities. *Acta Pol.Pharm.* 2008, 65, 6, 793-794.
- [49] Michał Zimecki, Jolanta Artym, Maja Kocięba, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Marcin Mączyński, Stanisław Ryng: Restoration of immune system function is accelerated in immunocompromised mice by the B-cell-tropic isoxazole R-11. *Pharmacol.Rep.* 2012, 64, 2, 403-411.
- [50] Michał Zimecki, Jolanta Artym, Maja Kocięba, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Marcin Mączyński, Stanisław Ryng: Immune function in cyclophosphamide-treated mice is restored by the T-cell-tropic isoxazole derivative R-13. *J.Immunotoxicol.* 2015, 12, 4, 322-329.
- [51] Angelika Drynda, Bożena Obmińska-Mrukowicz, Ewa Zaczyńska, Michał Zimecki, Stanisław Ryng, Marcin Mączyński: Immunoregulatory effects of 4-(4-chlorophenyl)-1-(5-amino-3-methylisoxazole-4-carbonyl)-thiosemicarbazide (06K) in non-immunized and SRBC-immunized mice. *J.Pharm.Pharmacol.(UK)* 2016, 68, 12, 1613-1620.
- [52] Paulina Płoszaj, Adam Junka, Bogumiła Szponar, Marcin Mączyński, Stanisław Ryng, Marzenna Bartoszewicz, Agnieszka Piwowar: Insights into mycobacterial activity and cytotoxicity of substituted isoxazole-4-carbohydrazide derivatives. *Acta Pol.Pharm.* 2018, 75, 3, 637-647.
- [53] Urszula Lipnicka, Marcin Mączyński, Jolanta Artym, Michał Zimecki: Synthesis and immunomodulatory activities of new 5-hydrazino-3-methyl-4-isothiazolecarboxylic acid ethyl esters. *Acta Pol.Pharm.* 2009, 66, 5, 501-511.

Marcin Mączyński