

**Aneta Kaczor**

*New 2-aminoimidazolone derivatives as adjuvants able to inhibit mechanisms of bacterial and cancer multidrug resistance*

## **Abstract**

Multidrug resistance (MDR) is a global problem in the treatment of bacterial infections and cancer. Therefore, searching for a way to overcome MDR is an important topic of pharmaceutical research. An interesting approach are so called adjuvants, *i.e.* the compounds able to block at least one mechanism of resistance. Some previously studied imidazolones indicated a potency of adjuvants for antibiotic and chemotherapeutic agents. Thus, studies performed within this PhD-thesis were focused on the search for new adjuvants, able to block bacterial and/or cancer mechanisms of resistance, in the group of 2-aminoimidazolones. Based on structure-activity relationship (SAR) for the previously found active compounds, new ones were designed; 49 of them were synthesized in 3-6-steps synthetic pathways, which always consisted of: (i) Knoevenagel condensation, (ii) *S*-methylation and (iii) reaction with amine. For some of primary amines, Dimroth rearrangement was observed. Moreover, additional synthesis pathways for aldehydes, through *O*-alkylation, and primary amines, in two-step synthesis, were carried out. Microbiological assays in *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella aerogenes* involved determination of antibacterial activity and ability to enhance antibiotics efficacy. Some of tested imidazolones displayed oxacillin or even ampicillin adjuvant activity in methicillin resistant *S. aureus* strains (MRSA). In T-lymphoma cancer cells, rhodamine 123, cytotoxicity and antiproliferative assays were performed in order to determine potential activity of adjuvant for chemotherapeutic agents of the final products. Tested imidazolones displayed activity in former assay or showed selected cytotoxicity in MDR cancer cells. An attempt to assess mechanisms of imidazolones' action was taken using both, *in silico* and *in vitro* assays. The allosteric modulation of the modified penicillin binding protein (PBP2a) was found the most probable mechanism of their action in MRSA strain, while blockage of AcrAB-TolC efflux pump in MDR *K. aerogenes* was pointed out. Interestingly, blocking other efflux pump, exactly ABCB1, was determined as potential mechanism of action in MDR cancer cells. For selected 2-aminoimidazolones, "drug-like" properties were determined in ADMETox, *i.e.* metabolic stability and mutagenicity, and physicochemical properties, (lipophilicity, water solubility), assays. Finally, SAR studies were conducted. The obtained results indicate that 2-aminoimidazolones can be considered potential adjuvants in the therapy of bacterial infections and cancer. Furthermore, they point out the need for further development of studies within this chemical group focused on MDR targets.

## Abstract in Polish

Lekooporność jest globalnym problemem leczenia zakażeń bakteryjnych oraz chorób nowotworowych. W związku z tym, poszukiwanie rozwiązań tego problemu jest ważnym aspektem nauk farmaceutycznych. Ciekawym rozwiązaniem są tzw. adjuwanty, czyli związki chemiczne zdolne do blokowania co najmniej jednego mechanizmu oporności na leki. Taka aktywność została zaobserwowana m.in. dla pochodnych imidazolonu. Stąd, badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowały poszukiwanie nowych adjuwantów, zdolnych do blokowania mechanizmów lekooporności bakteryjnej i/lub nowotworowej, w grupie pochodnych 2-aminoimidazolonu. Na podstawie badań zależności struktura-aktywność (SAR) dla wcześniej otrzymanych aktywnych połączeń zaprojektowano nowe związki, a 49 spośród nich zostało zsyntezowanych w 3-6 etapach, w każdym przypadku obejmujących: (i) kondensację Knoevenagla, (ii) S-metylację, (iii) reakcję z aminą, gdzie dla reakcji z aminą pierwszorzędową zaobserwowano przegrupowanie Dimrotha. Dodatkowe etapy syntezy przeprowadzono w celu uzyskania niedostępnych komercyjnie aldehydów, wykorzystując O-alkilowanie, a także amin pierwszorzędowych stosując dwa etapy syntezy Gabriela. Celem określenia aktywności biologicznej w szczepach bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Klebsiella aerogenes* przeprowadzono badania aktywności przeciwbakteryjnej oraz zdolności zmniejszania dawki skutecznej antybiotyków. Aktywne imidazolony wykazały zdolność do zmniejszania dawki skutecznej oksacyliny, a czasem i ampicyliny, w metycylinoopornym szczepie *S. aureus* (MRSA). Wykonano także testy akumulacji rodaminy 123, cytotoksyczności oraz działania antyproliferacyjnego w limfocytach T chłoniaka. Interesującym aspektem było odkrycie selektywnego działania cytotoksycznego względem lekoopornych komórek chłoniaka dla niektórych pochodnych. Dodatkowo, została podjęta próba określenia mechanizmów działania tych związków przy użyciu testów *in silico* oraz *in vitro*. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem w szczepie MRSA okazała się modulacja allosteryczna zmodyfikowanego białka PBP2a, podczas gdy blokowanie pompy AcrAB-TolC zostało wykazane w szczepie MDR *K. aerogenes*. W przypadku komórek nowotworowych, wyniki badań udowodniły kompetycyjne blokowanie pompy ABCB1. W celu określenia „lekopodobieństwa”, dla najbardziej obiecujących pochodnych zostały przeprowadzone eksperymentalne badania właściwości fizykochemicznych oraz ADMETox. Uzyskane wyniki posłużyły do przeprowadzenia analizy SAR. Wyniki dla 2-aminoimidazolonów potwierdziły ich interesującą aktywność biologiczną, jako potencjalnych adjuwantów obiecujących dla rozwoju terapii zakażeń bakteryjnych oraz choroby nowotworowej.