

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

Dr n. farm. Katarzyna Michalska

***Badanie mechanizmu rozdzielania chiralnego nowych
pochodnych oksazolidynonów***



*Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii
Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*

Warszawa 2018



Część badań finansowana była ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach realizacji grantu Sonata; UMO-2013/11/D/NZ7/01230, pt. „Badanie mechanizmu rozdziału chiralnego nowych pochodnych oksazolidynonów”, którego jestem kierownikiem i głównym wykonawcą.



Część badań finansowana była ze środków przeznaczonych na działalność statutową Zakładu Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie.



Część badań wykonywano korzystając z Infrastruktury PL-Grid.

1. Imię i Nazwisko: Katarzyna Michalska
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Dyplom magistra farmacji - Nr 5076/98 uzyskany 30 września 1998 roku na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt. „Oznaczanie zawartości histaminy w tkance chrzęstnej” z wynikiem bardzo dobrym.

Prawo wykonywania zawodu Aptekarza – Nr XIX01/2164/99 z dnia 5 października 1999 roku, przyznane uchwałą okręgowej Rady Aptekarskiej w Warszawie. Zostałam uprawniona do samodzielnego wykonywania zawodu aptekarza na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej.

Stopień doktora nauk farmaceutycznych – nadany 28 października 2008 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt.: „Optymalizacja metod elektroforezy kapilarnej stosowanych w badaniu produktów leczniczych zawierających wybrane antybiotyki” zrealizowana pod kierunkiem Prof. dr hab. Stefana Tyskiego. Praca uzyskała wyróżnienie *summa cum laude*, a powstała w ramach realizacji grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

01.12.1998 – 31.07.1999 roku - Instytut Reumatologii im. Prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, mgr stażysta.

Od 01.04.2001 roku zatrudniona w Instytucie Leków w Warszawie, obecnie Narodowym Instytucie Leków (NIL) w Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii NIL,

- 01.04.2001 – 31.10.2003 na stanowisku inżynierjno-technicznym,
- 01.11.2003 – 31.12.2008 na stanowisku asystenta,
- 01.01.2009 – nadal na etacie adiunkta,
- 01.02.2013 – nadal na stanowisku Kierownika Pracowni Fizykochemicznych Właściwości Antybiotyków Narodowego Instytutu Leków w Warszawie (od 02.01.2018 r. Kierownik Laboratorium).

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

- a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Badanie mechanizmu rozdzielania chiralnego nowych pochodnych oksazolidynonów.

- b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy):

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą postępowania habilitacyjnego jest spójny tematycznie cykl sześciu publikacji (5 oryginalnych) opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Dla każdej pracy podano współczynnik oddziaływania

czasopisma (*Impact Factor*) oraz punktację MNiSW. Wartości powyższych współczynników zostały przygotowane przez Bibliotekę Główną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

H.1. K. Michalska*, I. Karpiuk, M. Król, S. Tyski, Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 577-591.

Impact factor – 2,951; MNiSW – 30 punktów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, zebraniu danych potrzebnych do napisania pracy, analizie zebranych wyników, napisaniu: wprowadzenia, rozdziałów (2 – 5) i podrozdziałów (2.1, 2.2, 5.1 – 5.4) oraz podsumowania, przygotowania zarówno wstępnej i końcowej wersji pracy, sformułowaniu wniosków, korekcie edytorskiej i językowej, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy określłam na 74%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

H.2. K. Michalska*, E. Gruba, J. Cielecka-Piontek, E. Bednarek, Chiral separation of tedizolid using charge single isomer derivatives of cyclodextrins by capillary electrokinetic chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120 (2016) 402-412.

Impact factor – 3,255; MNiSW – 35 punktów

Mój udział w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania dotyczące chiralnego rozdzielania tedyzolidu, zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu całości eksperymentalnej dotyczącej techniki kapilarnej chromatografii elektrokinetycznej, przygotowaniu rycin 2, 4, 5, 7, 8, tabel 1 i 2, zebraniu wszystkich danych potrzebnych do napisania pracy oraz analizie zebranych wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, sformułowaniu wniosków, korekcie edytorskiej i językowej, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy określłam na 85%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

H.3. K. Michalska, M. Mizera, K. Lewandowska, J. Cielecka-Piontek*, Infrared, Raman, and ultraviolet with circular dichroism analyses and theoretical calculations of tedizolid, *Journal of Molecular Structure*, 1115 (2016) 136-143.

Impact factor – 1,753; MNiSW – 20 punktów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu pracy całego zespołu badawczego, zebraniu danych potrzebnych do napisania pracy, napisaniu wstępu, części rezultatów i dyskusji dotyczącej analizy z wykorzystaniem elektronowego dichroizmu kołowego, sformułowaniu wniosków, napisaniu wstępnej wersji pracy, korekcie edytorskiej i językowej.

Mój udział procentowy określłam na 60%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

H.4. K. Michalska*, E. Gruba, W. Bocian, J. Cielecka-Piontek, Enantioselective recognition of radezolid by cyclodextrin modified capillary electrokinetic chromatography

and electronic circular dichroism, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 139 (2017) 98-108.

Impact factor – 3,255; MNiSW – 35 punktów

Mój udział w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania dotyczące chiralnego rozdzielania radezolidu, zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu całości eksperymentalnej dotyczącej techniki kapilarnej chromatografii elektrokinetycznej w zakresie pH 2,5; 6,6; 8,2 oraz 9,6, przygotowaniu rycin 2AB, 3, 4, 5 oraz tabel 2 i 3, zebraniu danych potrzebnych do napisania pracy i analizie zebranych wyników, napisaniu wstępnej i końcowej wersji pracy, sformułowaniu wniosków, korekcie edytorskiej i językowej oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy określłam na 79%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

H.5. K. Michalska*, E. Gruba, M. Mizera, K. Lewandowska, E. Bednarek, W. Bocian, J. Cielecka-Piontek*, Application of spectroscopic methods (FT-IR, Raman, UV-CD and NMR) in studies of identification and optical purity of radezolid, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 183 (2017) 116-122.

Impact factor – 2,536; MNiSW – 30 punktów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu pracy całego zespołu badawczego, zebraniu danych potrzebnych do napisania pracy i analizie zebranych wyników, napisaniu wstępu, części rezultatów i dyskusji dotyczącej analizy z wykorzystaniem elektronowego dichroizmu kołowego, sformułowaniu wniosków, napisaniu końcowej wersji pracy, korekcie edytorskiej i językowej, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy określłam na 50%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

H.6. K. Michalska*, E. Bednarek*, E. Gruba, K. Lewandowska, M. Mizera, J. Cielecka-Piontek, Comprehensive spectral identification of key intermediates to the final product of the chiral pool synthesis of radezolid, *Chemistry Central Journal* 11:82 (2017) 1-16.

Impact factor – 2,442; MNiSW – 30 punktów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, koordynowaniu pracy całego zespołu badawczego, zebraniu danych potrzebnych do napisania pracy, analizie zebranych wyników, napisaniu wstępu, części rezultatów i dyskusji dotyczącej analizy z wykorzystaniem elektronowego dichroizmu kołowego, sformułowaniu wniosków, złożeniu informacji zawartych w materiałach dodatkowych, przygotowaniu końcowej wersji pracy, korekcie edytorskiej i językowej, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy określłam na 40%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **16,192**, a punktacja MNiSW – **180**. Autor korespondencyjny oznaczony, *.

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

W związku z zakresem celu naukowego omawianych prac wprowadzenie składa się z następujących części:

- *Rozdział I* poświęcony jest charakterystyce chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych z klasy oksazolidynonów, ich mechanizmie działania, oporności drobnoustrojów, zależności pomiędzy strukturą a toksycznością oraz kierunkom w projektowaniu nowych pochodnych z klasy oksazolidynonów.
- W *rozdziale II* przedstawiono teoretyczne uzasadnienie badań, w tym ewolucję poglądów na temat mechanizmów chiralnego rozpoznawania, scharakteryzowano cyklodekstryny i ich możliwości tworzenia kompleksów inkluzyjnych, oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy chiralnym selektorem i selektandem oraz założenia i cel badań.

Rozdział I

Nieprzerwanie rośnie liczba poważnych zakażeń powodowanych przez drobnoustroje odporne równocześnie na wiele antybiotyków, tzw. zjawisko oporności wielolekowej. Równolegle liczba skutecznych środków przeciwbakteryjnych ulega zmniejszeniu, ponieważ mikroorganizmy są w stanie wytworzyć nowe mechanizmy oporności i szybko rozprzestrzeniać geny kodujące oporność poprzez ruchome elementy genetyczne bakterii, głównie plazmidy, integrony i transpozomy. Konsekwencją rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki wśród drobnoustrojów jest realne zagrożenie dla życia i zdrowia publicznego. Skalę tego problemu obrazuje przykład Stanów Zjednoczonych, gdzie corocznie 2 miliony osób zostaje dotkniętych zakażeniami powodowanymi przez bakterie odporne na antybiotyki, z czego odnotowuje się 23 tysiące zgonów rocznie, w Europie 25 tys. [1]. I chociaż zakażenia powodowane przez pałeczki Gram-ujemne są obecnie szczególnie niebezpieczne (Enterobacteriaceae o oporności typu ESBL, AmpC, MBL, KPC, OXA-48), to liczba poważnych zakażeń powodowanych przez bakterie Gram-dodatnie, tj.: odporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA), odporne na metycylinę koagulazo-ujemne gronkowce (MRCoNS), gronkowce niewrażliwe na glikopeptydy (GISA, GRSA, VISA,

VRSA) oraz enterokoki oporne na glikopeptydy (GRE, VRE), a także *Streptococcus pneumoniae* oporny na antybiotyki beta-laktamowe, jest również znacząco wysoka.

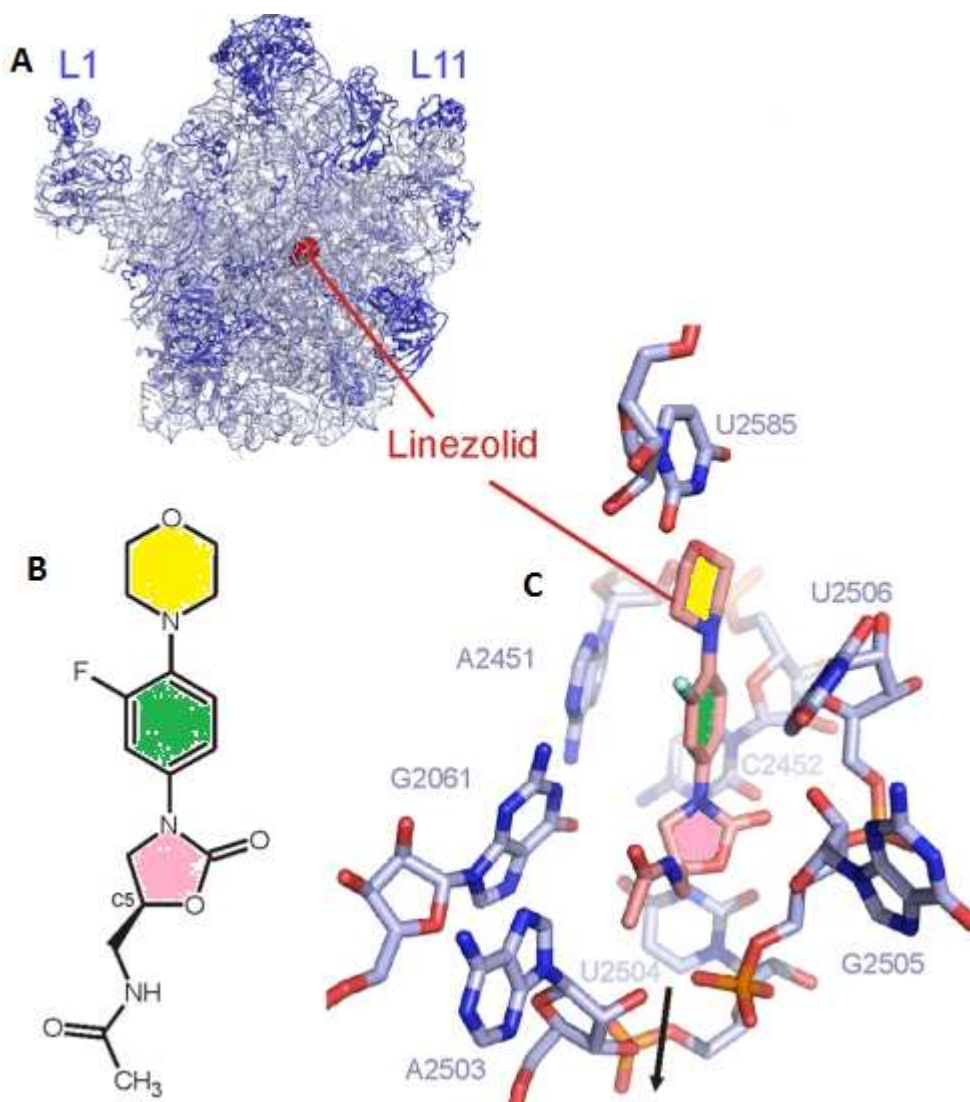
Z tego względu odkrycie lub wynalezienie nowych skutecznych związków przeciwbakteryjnych jest bardzo istotne. Wiele zespołów badawczych ukierunkowanych na badania i rozwój realizuje prace rozwojowe w tej dziedzinie.

Oksazolidynony, jako chemioterapeutyki przeciwbakteryjne odkryto w E.I. Du Pont Nemours & Company w latach osiemdziesiątych XX-stego wieku, rozwijano w Pharmacia i Upjohn (obecnie część firmy Pfizer), prowadząc ostatecznie do zarejestrowania linezolidu [2]. Stało się to po blisko 30 latach przerwy od momentu wprowadzenia do leczenia poprzedniej, oryginalnej klasy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych, fluorowanych chinolonów.

Jedynymi przedstawicielami chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych z klasy oksazolidynonów zatwierdzonymi przez Europejską Agencję Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*) oraz amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) jest wspomniany linezolid, a od niedawna również tedyzolid fosforanu (2015 r.). Oksazolidynony są bardzo skuteczne w leczeniu poważnych zakażeń powodowanych przez bakterie Gram-dodatnie, w tym infekcji powodowanych przez niebezpieczne szczepy MRSA oraz oporne na wankomycynę szczepy *Enterococcus faecium* (VRE).

Wcześniejsze badania dotyczące mechanizmu działania oksazolidynonów sugerowały, że hamują one tworzenie kompleksu inicjującego proces translacji przez uniemożliwienie tworzenia kompleksu potrójnego, N-formylometionylo-tRNA-rybosomu-mRNA [3]. Jednak zdolność oksazolidynonów do hamowania tworzenia kompleksu inicjującego obserwowano tylko przy wysokim wysyceniu rybosomów przez oksazolidynony. Mechanizm działania oksazolidynonów oraz dokładna lokalizacja miejsca wiążącego lek w rybosomie nie są w pełni poznane. Niemniej jednak, badania wykazały, że oksazolidynony oddziałują z podjednostką 50S rybosomu w miejscu A centrum aktywnego peptydylotransferazy (PTC), która zachodzi na resztę aminoacylową-tRNA związaną z miejscem A, powodując zmiany konformacyjne w obrębie nukleotydu U2585 [4]. Nukleotyd ten podlega zmianom konformacyjnym, ale po związaniu linezolidu przez rybosom, konformacja U2585 stabilizuje się i staje się nieaktywna. Jest to związane z powstaniem wiązania wodorowego pomiędzy atomem azotu U2585 a atomem tlenu w pierścieniu morfolinowym linezolidu. Wydaje się to dość zaskakujące, że stosunkowo słabe oddziaływanie wodorowe zdaje się być jedynym

wiązaniem pomiędzy linezolidem a RNA, tym samym zmniejszając ważność oddziaływań mniej bogatych energetycznie wiązań van der Waalsa i hydrofobowych, pomiędzy linezolidem a nukleotydami w obrębie kieszeni PTC. Pierścień A, jak również łańcuch w pozycji C5 rozciąga się w głąb kieszeni PTC. Pierścień oksazolidynonu ułożony jest w kierunku nukleotydu U2504 (choć geometria i odległość nie jest optymalna dla oddziaływań π - π), natomiast łańcuch C5 rozciąga się w kierunku nukleotydu A2503 podjednostki 23S rRNA. Pierścień B jest skręcony o około 70° w stosunku do pierścienia A i ułożony pomiędzy A2451 i U2506 (schemat miejsca wiążącego przedstawiono na **rycinie 1**). Zmiana konformacji po dopasowaniu cząsteczki linezolidu w kieszeni widoczna jest jedynie dla nukleotydu U2585. Nukleotyd ten wymagany jest dla prawidłowego wiązania tRNA do miejsca P. W konsekwencji linezolid hamuje proces syntezy białek poprzez blokowanie funkcji rybosomalnych [4-6].



Rycina 1. Podjednostka 50S *D. radiodurans* z zaznaczoną pozycją wiązania linezolidu (czerwony kolor) oraz białkami L1 i L11 (A), struktura linezolidu z zaznaczonymi pierścieniami, oksazolidynowym

(różowy), fenylowym (zielony), morfolinowym (żółty) (**B**), linezolid w kieszeni wiążącej utworzonej przez osiem nukleotydów podjednostki 23S rRNA (**C**). Na podstawie ryciny zamieszczonej w pracy Wilsona i wsp. [4].

Wilson i wsp. [4] przedstawili krystalograficzny model struktury podjednostki 50S rybosomu u *Deinococcus radiodurans*, (D50S) w kompleksie z linezolidem, tym samym pozwalając zrozumieć, a w konsekwencji dając możliwość przewidywania potencjalnych kierunków dla racjonalnego rozwoju kolejnych generacji oksazolidynonów. Do antybiotyków, które działają na centrum PTC zaliczamy również: chloramfenikol, linkozamidy, pleuromutyliny, streptograminy oraz sparsomycynę. Wydaje się, że mechanizm działania linezolidu jest najbardziej podobny do chloramfenikolu. Chloramfenikol i linezolid nie blokują translacji całkowicie, pozwalają na translację pewnych sekwencji aminokwasowych zanim w pełni zablokują translację. Obecność alaniny (Ala), w mniejszym stopniu seryny (Ser) i treoniny (Thr) na przedostatnim miejscu w ulegającym elongacji łańcuchu polipeptydowym aktywizuje działanie leku. W przeciwieństwie do glicyny (Gly), która występując w miejscu P czy miejscu A, PTC silnie przeciwdziała hamującemu działaniu chloramfenikolu i linezolidu [7]. Pozostałe antybiotyki działają jako inhibitory rybosomalnego PTC blokując translację niespecyficznie, już od pierwszego aminokwasu.

Niestety, stosunkowo szybko po wprowadzeniu linezolidu do terapii zakażeń, zanotowano przypadki oporności na linezolid wśród szpitalnych izolatów *S. aureus* [8, 9] i *Enterococcus* spp. [10]. Chociaż oporne na linezolid szczepy (LinR) pojawiają się stosunkowo rzadko to zakażenia spowodowane przez nie należy traktować jako zakażenia potencjalnie zagrażające życiu. Są dwa główne mechanizmy oporności na linezolid, jeden związany z mutacją (G2576T) w 23S rRNA oraz drugi związany z obecnością rybosomalnej przenośnej metylotransferazy, *cfr*.

Renslo [11] zebrał i usystematyzował analogi linezolidu, będące na etapie badań klinicznych, wskazując zależność pomiędzy strukturą a toksycznością oksazolidynonów, która związana jest z efektem hamowania syntezy białek w mitochondriach (MPSi, ang. *Mitochondrial Protein Synthesis*) oraz hamowaniem enzymu monoaminooksydazy (MAOi, ang. *Monoamine Oxidase Inhibition*). Efekt MPSi jest odpowiedzialny za wystąpienie odwracalnej mielosupresji. Biorąc to pod uwagę naukowcy koncentrują się na ukierunkowanym modyfikowaniu struktury oksazolidynonów i poszukują pochodnych o następujących właściwościach: (a) poszerzonym spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, obejmującym również pałeczki Gram-ujemne; (b) aktywności

przeciwko szczepom LinR; (c) udoskonaleniu profilu bezpieczeństwa prowadzącego do obejścia lub co najmniej minimalizacji mielosupresji.

Ze względu na fakt posiadania przez linezolid wielu pożądaných właściwości farmakologicznych oraz odniesienia sukcesu komercyjnego, linezolid stał się atrakcyjnym punktem wyjścia dla projektowania nowych środków przeciwbakteryjnych z tej klasy. W związku z tym wiele modyfikacji strukturalnych linezolidu pojawiło się w ostatnich latach. Do tej pory kierunki modyfikacji chemicznej struktury oksazolidynonów, obejmowały modyfikację każdego z pierścieni linezolidu, A (oksazolidynonu), B (fluorofenyłowego) i C (morfolinowego). Zmiany dotyczyły również podstawnika w pozycji C5 w pierścieniu oksazolidynonu. Spośród znanych pochodnych, jeden, tedyzolid został ostatnio zarejestrowany (06.2014 przez FDA, 03.2015 przez EMA), natomiast trzy oksazolidynony są obecnie na etapie badań klinicznych: radezolid, sutezolid i posizolid.

Radezolid (RX-1741, dawniej Rx-01_667), zsyntetyzowany przez Rib-X, zakończył dwa badania fazy II badań klinicznych, pierwszy w szpitalnym zapaleniu płuc (CAP, zakończony w kwietniu 2009 r.), a drugi w nieskomplikowanych zakażeniach skóry (zakończony w czerwcu 2009 r.) [12, 13]. Natomiast Pfizer i AstraZeneca pracują nad dwoma związkami przeciw prątkowymi, które zakończyły badania kliniczne fazy 1: pochodną tiomorfolinową linezolidu, sutezolidem (PNU-100480, PF-02341272) oraz posizolidem (znanym także jako AZD5847 lub AZD2563) [14].

W celu uzyskania pełnego obrazu aktywności biologicznej oksazolidynonów, należy wspomnieć o różnorodności zastosowań pierścienia oksazolidynowego, jako farmakoforu uważanego za ważny strukturalnie model w chemii organicznej [15]. Obejmuje on nową generację wybiórczych inhibitorów monoaminooksydazy typu MAO-A (befloksaton lub silnie działające i selektywne pochodne 3-(1*H*-pirol-3-ilo)-2-oksazolidynonu [16], substancje przeciwnowotworowe [17, 18], inhibitory reduktazy aldozowej [19], jak również składniki biologiczne aktywnych produktów naturalnych, np. związek przeciwpłatkowy - cykloseryna, modulatory cytokin, czy łagodnie działający związek przeciwbakteryjny – streptazolina.

Jeśli chodzi o chemię oksazolidynonów, Ager i wsp. [20] omówili klasyczne, jak i niekonwencjonalne drogi syntezy oksazolidynonów. Początkowe syntezy chiralnych oksazolidyn-2-onów, przy użyciu chiralnych 1,2-aminoalkoholi i ich heterocyklicznych pochodnych jako chiralnych pomocników, częściej wykorzystywały toksyczny fosgen w reakcjach z aminoalkoholami. Później opracowano wysoce wydajne metody syntezy

pierścienia oksazolidynonu z dialkilowych estrów kwasu karbonylowego [21]. Ponadto Zappia i wsp. [22] przedstawili zastosowania w syntezie chemii organicznej dla oksazolidyn-2-onów jako skutecznych chiralnych substancji pomocniczych, między innymi w asymetrycznej reakcji alkilowania, asymetrycznej reakcji aldolowej, cykloaddycji, addycji 1,4-dienów, jak również w asymetrycznej reakcji [2+2]-fotocykloaddycji, lub reakcji wolnorodnikowej kopolimeryzacji promowanej przez kwasy Lewisa.

Rozdział II

Wiele prac przeglądowych [23-27] i specjalnych opracowań w całości poświęconych chiralnemu rozdzielaniu przedstawia ewolucję poglądów na temat mechanizmów chiralnego rozpoznawania, podkreślając znaczenie tych badań oraz podsumowując najważniejsze zasady teoretyczne opisujące zjawiska chiralnego różnicowania; od trójpunktowego modelu oddziaływań poprzez podstawowe aspekty enancjoseparacji aż do wyznaczenia parametrów termodynamicznych mających wpływ na chiralne oddziaływanie pomiędzy selektorem a selektandem.

W celu uzyskania chiralnego rozróżnienia w modelu trójpunktowego oddziaływania [28] założono konieczność powstania przynajmniej trzech oddziaływań przyciągających lub dwóch przyciągających i jednego odpychającego pomiędzy selektorem i selektandem. Oczwistym jest, że jedno z tych oddziaływań musi zależeć od stereochemii centrum stereogenicznego, lub podstawnika w centrum chiralnym. W ten sposób trzypunktowy model Eassona i Stedmana [28], zaadoptowany przez Ogstona [29] stał się akceptowaną wersją wyjaśnienia, w jaki sposób enzymy rozróżniają izomery D i L w podręcznikach biochemii i chemii. Ponieważ okazało się, że chiralne rozróżnianie może być zależne od achiralnych czynników, zaczęto kwestionować model trójpunktowego rozdzielania. W roku 2000, kiedy Mesecar i Koshland [30] badali mechanizm działania enzymu dehydrogenazy izocytrynianowej odkryli, że hipoteza Ogstona może być prawidłowa, jedynie dla substratów posiadających budowę planarną. Dla substratów posiadających budowę aksjalną, czy helikalną model trójpunktowego przyłączania nie jest właściwy. Stwierdzili, że w istocie trzy grupy węgla tetraedrycznego, np. *a*, *b* i *c* izocytrynianu, aktywnego enancjomeru (izomeru D) wiążą się z tymi samymi aminokwasami na powierzchni enzymu (miejsca oznaczone jako *a'*, *b'* i *c'*), z którymi wiąże się nieaktywny izomer L. Jedynie orientacja czwartej grupy —OH węgla C2, znajdująca się w punkcie *d*, a umieszczona w różnym

kierunku w przypadku dwóch izomerów izocytrynianu (D i L) różnicuje oddziaływanie z celem molekularnym. Tak więc model trójpunktowego przyłączania nie mógł być powodem chiralnego rozróżnienia izocytrynianu przez dehydrogenazę izocytrynianową. W rzeczywistości stwierdzili, że główną różnicą była orientacja czwartej grupy. W przypadku izomeru L grupa OH wiązała się z arginina 119, podczas gdy w przypadku izomeru D, grupa OH oddziaływała z jonem magnezu, który był przyłączony do kompleksu Asp-311, Asp-283 i Asp-307. W rezultacie Mesecar i Koshland [30] stworzyli nowy model, który wymaga uwzględnienia czwartej lokalizacji, tj. dodatkowego czwartego miejsca oddziaływania lub trzech miejsc wiązania i jednego kierunku (ang. *the four location model*).

Dodatkowo Davankov [31] badając mechanizm chiralnego rozróżnienia biopolimerów zwrócił uwagę na decydujący wpływ sterycznego dopasowania selektora z selektandem, co skutkuje większą liczbą oddziaływań, która wówczas jest z reguły większa od trzech.

Stosując cyklodekstryny (CDs, ang. *cyclodextrins*) jako sztuczne receptory molekularne, obok eterów koronowych, cyklicznych poliamin, kaliksarenów, kukurbituryli i pillararenów, głównie dochodzi do powstania kompleksów inkluzyjnych i selektywnego oddziaływania z selektandem.

W dalszej części autoreferatu omówione zostaną CDs, ponieważ to one zostały wybrane jako model do badania mechanizmu rozdzielania chiralnego nowych pochodnych oksazolidynonów. Najczęściej stosowane CDs zbudowane są z sześciu (α -CD), siedmiu (β -CD) lub ośmiu (γ -CD) jednostek D-glukozy połączonych wiązaniami α -1,4 glikozydowymi. Cyklodekstryny mają budowę ściętego stożka, który otwarty jest na obu końcach. Jedno z obrzeży modelowego stożka otoczone jest drugorzędowymi grupami hydroksylowymi przy węglach C2 i C3, natomiast węższy otwór CD otoczony jest bardziej polarnymi pierwszorzędowymi grupami –OH znajdującymi się przy węglach C6. We wnętrze CD znajdują się atomy H3 i H5 oraz niezwiązane elektrony z tlenu glikozydowych, co nadaje wnętrzu charakter hydrofobowy. Natomiast pierwszorzędowe i drugorzędowe grupy hydroksylowe, odpowiednio w pozycji C6 oraz C2 i C3 nadają powierzchni CD charakter hydrofilowy. Co więcej cząsteczka CD jest elastyczna, dzięki mostkom glikozydowym, C1—O—C4 łączącym poszczególne jednostki glukopiranozy. Związki te posiadają zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych typu „gość-gospodarz” właśnie dzięki obecności hydrofobowego wnętrza i pewnej elastyczności, stanowiąc w ten sposób cząsteczkę „gospodarza” dla rozmaitych cząsteczek lub jonów.

Budowa geometryczna cząsteczek „gościa” determinuje selektywność procesu kompleksowania. Jednym z warunków utworzenia kompleksu inkluzyjnego jest to, że cząsteczki „gościa” muszą w całości, albo przynajmniej w znacznej części wnikać do wnętrza CD. Steryczne dopasowanie nie jest jednak jedynym wymogiem chiralnego różnicowania. Musi ono być uzupełnione oddziaływaniami elementów strukturalnych „gościa” z grupami funkcyjnymi obecnymi na krawędzi toroidalnej struktury CD, czyli oddziaływaniami grup hydroksylowych w pozycji C2 i C3, tworzącymi w ten sposób wiązania wodorowe lub oddziaływania typu dipol-dipol [32]. Wówczas oddziaływanie chiralnego centrum bądź podstawnika na chiralnym centrum z natywnymi grupami hydroksylowymi bądź podstawionymi grupami hydroksylowymi w pozycji C2, C3 i C6, decydują o chiralnym różnicowaniu. Powstający kompleks inkluzyjny jest zazwyczaj bardziej stabilny od substratów, a tym samym układ taki jest bardziej korzystny energetycznie. W ogromnej większości powstających w ten sposób kompleksów stosunek molowy cząsteczki „gościa” do „gospodarza” wynosi 1:1. W większości przypadków proces kompleksowania jest regioselektywny i stereospecyficzny, a CD wykazują selektywność substratową. Oprócz tworzenia kompleksów inkluzyjnych [33-35] możliwe jest również chiralne rozróżnianie enancjomerów poprzez tworzenie stereoselektywnych oddziaływań zewnętrznych [34-37]. Obraz ten ulega skomplikowaniu jeżeli o chiralnym różnicowaniu współdecydują również czynniki achiralne, np. polarne modyfikatory organiczne. Gübitz i Schmid [38] uważają, że organiczny modyfikator zajmuje wówczas wnękę CD, co uniemożliwia tworzenie kompleksów inkluzyjnych. Wyniki z rozdzielania w warunkach niewodnych NACE (ang. *non-aqueous capillary electrophoresis*), poparte badaniami protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*), w szczególności korzystając z technik wielowymiarowych NOESY (ang. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*), oraz ROESY (ang. *rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy*) potwierdzają tę hipotezę [34, 35, 37]. Homojądrowa technika wielowymiarowa, NOESY, wykorzystuje efekt NOE, umożliwiając określenie wzajemnego położenia/odległości protonów w przestrzeni. Istnieje również technika jednowymiarowa NOESY, w której próbka naświetlana jest promieniowaniem elektromagnetycznym o częstotliwości odpowiadającej częstotliwości jednego z protonów badanego związku, wówczas protony znajdujące się w odległości mniejszej niż około 5 Å od naświetlonego protonu dają silniejsze sygnały na widmie w stosunku do sygnałów rejestrowanych bez uprzedniego naświetlania, co zostało zastosowane w przez Chankvetadze i wsp. do

wyjaśnienia oddziaływań talinololu z HDMS- β -CD oraz HDAS- β -CD [35]. Natomiast ROESY to spektroskopia NOE w rotującym układzie współrzędnych, pozwalająca na obserwację sygnałów korelacyjnych dla cząsteczek o średnich rozmiarach, które w technice NOESY są słabe lub niewykrywalne [35].

Tworzenie przejściowych diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy chiralnym selektorem i selektandem odbywa się poprzez różnorodne oddziaływania międzycząsteczkowe zarówno jonowe, jak i oddziaływania jon-dipol lub dipol-dipol, oddziaływania π - π , van der Waalsa i wiązania wodorowe [39]. Silne oddziaływania o długim zasięgu, jak oddziaływania jonowe są często uważane za te, które jako pierwsze zaangażowane są w początkowym etapie, ponieważ wówczas oba enancjomery niestereoselektywnie wiążą się do selektora. W przeciwieństwie do oddziaływań o krótkim zasięgu, takich jak wiązania wodorowe i oddziaływania π - π , będące przede wszystkim odpowiedzialne za powstanie wiązań stereoselektywnych. Co więcej, steryczne dopasowanie wynikające z układu przestrzennego wnęki wiążącej do selektanda może przyczyniać się do chiralnego różnicowania, co zostało zasygnalizowane już wcześniej. Poza tworzeniem oddziaływań międzycząsteczkowych, również wydalenie wysokoenergetycznej wody z wnęki CD może odgrywać rolę w tworzeniu chiralnych kompleksów. Wnętrze CD jest okupowane przez cząsteczki wody w liczbie uzależnionej od wielkości wnęki. Cząsteczki te są „niezorganizowane”, nie mogą utworzyć stabilnej sieci, ponieważ możliwe jest utworzenie tylko ograniczonej liczby wiązań wodorowych. W związku z tym entalpia staje się siłą napędową zdolną do tworzenia kompleksów typu „gość-gospodarz”, ponieważ prowadzi do powstania korzystniejszych układów pod względem termodynamicznym. Dochodzi do wyrzucenia cząsteczek wody z wnętrza wnęki na zewnątrz, tam, gdzie istnieje większe prawdopodobieństwo utworzenia bardziej stabilnych wiązań wodorowych, a powstały wówczas kompleks „gość-gospodarz” utrzymywany jest na zasadzie oddziaływań hydrofobowych i/lub van der Waalsa [40]. Efekty hydrofobowe opisano w pracy Biedermanna i wsp. [41].

Metody, które mogą odpowiednio scharakteryzować oddziaływania międzycząsteczkowe i opisać powstające kompleksy inkluzyjne w roztworach obejmują nie tylko metody spektralne (spektroskopia UV-Vis, dichroizm kołowy, fluorescencję, magnetyczny rezonans jądrowy i elektronowy rezonans spinowy), techniki elektromigracyjne i separacyjne (CE, ang. *capillary electrophoresis*, HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*), ale także polarymetrię i izotermiczną kalorymetrię

miareczkową [42]. Natomiast w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy lekiem, a CD w cieple stałym wykorzystuje się najczęściej metody analizy termicznej, dyfrakcji rentgenowskiej i techniki spektroskopowe, takie jak spektroskopia w podczerwieni (FTIR, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) i rozpraszania Ramana [43].

Celem osiągnięcia naukowego jest chiralne rozdzielanie nowo opracowanych kandydatów na leki z grupy oksazolidynonów oraz próba poznania i wyjaśnienia mechanizmów tego rozdzielania. Jako model wybrano pochodne najbardziej interesujące pod względem aktywności przeciwbakteryjnej oraz najbardziej zaawansowane na etapie badań klinicznych, tedyzolid i radezolid. Ten ogólny cel badań został podzielony na pięć bardziej szczegółowych zagadnień, które wspólnie pozwolą poznać mechanizm rozdzielania badanej grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych:

1. opracowanie zasad chiralnego rozdzielania nowych pochodnych oksazolidynonów za pomocą cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem, pełniących rolę chiralnego czynnika różnicującego, metodą kapilarnej chromatografii elektrokinetycznej (cEKC, ang. *capillary electrokinetic chromatography*), wyznaczenie stałych tworzenia kompleksów. W celu określenia wpływu poszczególnych elementów struktury związków modelowych na rozdzielanie chiralne, badania prowadzono równocześnie dla związków modelowych i linezolidu;
2. śledzenie przemian konformacyjnych oraz określenie właściwości chiralooptycznych nowych pochodnych poprzez badanie widma elektronowego dichroizmu kołowego (ECD, ang. *Electronic Circular Dichroism*). Część eksperymentalną wykonano we współpracy z Pracownią Spektroskopii Optycznej IChO PAN;
3. dostarczenie bezpośrednich informacji o geometrii kompleksów inkluzyjnych, bądź oddziaływań zewnętrznych; wykonanie pomiarów z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*). Zadanie było realizowane we współpracy z Zakładem Leków Sfałszowanych i Używek NIL;
4. obliczenie najbardziej korzystnej ze względów termodynamicznych struktury kompleksów na podstawie wyników eksperymentalnych otrzymanych z pomiarów NMR metodą modelowania molekularnego, umożliwiając w ten sposób

zrozumienie procesu chiralnego różnicowania nowych pochodnych z wybranymi cyklodekstrynami. Zadanie było realizowane we współpracy z Zakładem Leków Sfałszowanych i Używek NIL;

5. potwierdzenie tożsamości zsyntetyzowanych nowych pochodnych oksazolidynonów, radezolidu oraz kluczowych produktów pośrednich otrzymanych na drodze enancjoselektywnej syntezy, wykorzystując metody spektroskopowe, FT-IR, rozpraszania Ramana oraz NMR. Zadanie było realizowane we współpracy z dr hab. Judytą Cielecką-Piontek z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Zakładem Leków Sfałszowanych i Używek NIL.

Lepsze zrozumienie mechanizmów rozdzielania enancjomerów należących do grupy nowych pochodnych oksazolidynonów przyczyni się do rozwoju wiedzy o niekwalencyjnych oddziaływaniach międzycząsteczkowych oraz do rozwoju chemii supramolekularnej badanej grupy produktów leczniczych. Tematyka badań jest ważna także w odniesieniu do podmiotu badań – oksazolidynonów, które wobec rosnącej oporności, stanowią szczególnie istotną klinicznie grupę leków działających przeciwbakteryjnie.

Wyniki uzyskano w trakcie realizacji grantu Sonata finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Grant jest w trakcie realizacji. Obecnie część dotycząca badań NMR i modelowania molekularnego dla kompleksów tедыzolidu z HDAS- β CD, chiralnego różnicowania dla kolejnej pochodnej oksazolidynonów, sutezolidu, badań tożsamościowych dla sutezolidu jest zaawansowana i została przedstawiona w postaci doniesień zjazdowych (I.7., I.9. i I.10.).

H.1. Pierwsza praca w cyklu habilitacyjnym wpisuje się w cykl prac mających na celu aktualizację, zebranie i analizę osiągnięć z zakresu syntezy i badań przedklinicznych nowych pochodnych oksazolidynonów. Efekty wzmożonej aktywności naukowców zajmujących się poszukiwaniem nowych, skutecznych pochodnych z klasy oksazolidynonów zostały opisane w licznych pracach przeglądowych. Renslo i wsp. [44] dokonali przeglądu piśmiennictwa dotyczącego nowych pochodnych oksazolidynonów uwzględniając wyniki prezentowane w okresie od 2003 do połowy 2005 r. Przegląd badań w tej dziedzinie przed rokiem 2003 został podsumowany przez Hutchinsona [45]. Poce i wsp. [46] dokonali przeglądu stanu wiedzy na temat zgłoszeń patentowych

dotyczących oksazolidynonów od połowy 2004 do końca 2006 roku. W pracy **H.1.** dokonano przeglądu piśmiennictwa i zgłoszeń patentowych dotyczących nowych pochodnych oksazolidynonów będących na etapie badań przedklinicznych i klinicznych obejmując swym zakresem lata 2006 - 2012. Natomiast Phillips i wsp. [47] dokonali przeglądu patentów, obejmując okres 2012 - 2015.

W publikacji **H.1.** nowe analogi oksazolidynonów zostały scharakteryzowane i podzielone na odpowiednie grupy w zależności od modyfikacji struktury cząsteczki linezolidu i kierunku badań zależności pomiędzy strukturą, a aktywnością (SAR, ang. *structure-activity relationship*). Podział na rozdziały i podrozdziały został przeprowadzony stosownie do modyfikacji łańcucha bocznego i/lub rodzaju pierścienia i chociaż proces syntezy zazwyczaj był ukierunkowany na modyfikację kilku elementów struktury linezolidu równocześnie, przyporządkowanie do odpowiedniego rozdziału zostało uzależnione od kierunku badań SAR. Omówiono nowe pochodne biorąc pod uwagę następujące modyfikacje strukturalne:

1. Modyfikacja łańcucha bocznego w pozycji C5 pierścienia oksazolidynonu;
 - 1.1. strategia obejmująca dodanie heterocykli do pozycji C5,
 - 1.2. strategia polegająca na dodaniu acyklicznego podstawnika do pozycji C5,
2. Modyfikacja pierścienia A;
3. Modyfikacja pierścienia B;
4. Modyfikacja pierścienia C;
 - 4.1. sprzężenie pierścieni B i C,
 - 4.1.1. trójcykliczne oksazolidynony,
 - 4.2. dodanie dodatkowych grup lub pierścieni do ustalonego pierścienia typu C,
 - 4.3. rozdzielenie pierścieni C i D poprzez łącznik,
 - 4.4. nowe pierścienie C,
 - 4.4.1. system pierścieni połączonych, biaryle,
5. Hybrydowe oksazolidynony.

W podsumowaniu pracy **H.1** zwrócono uwagę, iż chociaż opracowano wiele nowych pochodnych, które na ogół posiadały większą aktywność przeciwbakteryjną niż linezolid, to jedynie tedyzolid przeszedł do III etapu badań klinicznych (obecnie zatwierdzony przez FDA i EMA). Wiele analogów nie zdołało przejść badań klinicznych fazy I, np. bardzo obiecujący analog, PF-708093, głównie z powodu niekorzystnych właściwości toksykologicznych. Jedynie dwa związki zawierające biarylowe układy pierścieniowe, wspomniany już tedyzolid i radezolid, przeszły do kolejnych etapów

badania klinicznych. Oba związki charakteryzują się wyższym powinowactwem do miejsca wiązania w rybosomie, przewyższając tym samym rybosomalne mutacje i uzyskując aktywność wobec szczepów LinR.

Tedyzolid [48, 49] ((5*R*)-3-{3-fluoro-4-[6-(2-metyl-2*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)pirydyn-3-yl]fenyl}-5-(hydroksymetyl)-1,3-oksazolidyn-2-on zarejestrowany w postaci proleku, tedyzolidu fosforanu (SIVEXTRO®) zawiera biarylowy pirydylofenylowy układ pierścieniowy. Tedyzolid ma korzystny profil bezpieczeństwa i został zatwierdzony do leczenia ostrych zakażeń bakteryjnych skóry i tkanek miękkich wywołanych przez wrażliwe bakterie u osób dorosłych, *Staphylococcus aureus* (w tym szczepy MRSA), *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. anginosus* i *Enterococcus faecalis*. Tedyzolid uzyskiwał wartości MIC 4-razy korzystniejsze w stosunku do wrażliwych i opornych szczepów *S. aureus* w stosunku do wartości MIC uzyskiwanych przez linezolid. Co istotne, tedyzolid jest aktywny w stosunku do szczepów posiadających gen *cfr* metylotransferazy odpowiedzialny za oporność gronkowców na linezolid [50]. Skuteczność tedyzolidu wobec tych szczepów związana jest z obecnością grupy hydroksymetylowej w pozycji C5 (centrum stereogeniczne). Badania SAR wykazały nieoczekiwanie silną aktywność grupy hydroksymetylowej w porównaniu do grupy metylacetamidowej w pozycji C5 pierścienia oksazolidynonu. Tym samym przecząc wcześniejszym wynikom SAR dotyczącym pochodnych 3-arylo-2-oksooksazolidynowych, oksotriazolowych oraz piperazylofenyloowych, gdzie odpowiednie pochodne 5-hydroksymetylowe wykazywały znacząco słabszą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do analogów zawierających grupę metylacetamidową [51-53]. Z drugiej strony, wyniki te były zbliżone do rezultatów opisanych przez zespół badawczo-rozwojowy Ranbaxy, gdzie jedynie niewielkie podstawniki w pozycji C5 były akceptowalne [54]. Dodatkowo przez optymalizację układów pierścieniowych C (pirydyny) i D (tetrazolu) tedyzolidu, uzyskano możliwość powstania dodatkowych oddziaływań z górnym obszarem centrum peptydylotransferazy podjednostki 50S rybosomu osiągając tym samym wzmocnienie oddziaływań z miejscem wiążącym.

Kolejny oksazolidynon, radezolid [55] N-{{(5*S*)-3-[3-fluoro-4-(4-[(1*H*-1,2,3-triazol-5-ylmetyl)amino]metyl)fenyl]fenyl}-2-okso-1,3-oksazolidyn-5-yl)metyl}acetamid wykazuje aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do patogenów powodujących pozaszpitalne zapalenie płuc (CAP, ang. *community-acquired pneumonia*), takich jak *H. influenzae* i *M. catarrhalis*. Wartości MPSi i MAOi dla tedyzolidu i radezolidu nie zostały publicznie ujawnione. Jednakże, na podstawie informacji zawartych w zgłoszeniu patentowym,

można wnioskować, że wybór tedyzolidu opierał się raczej na maksymalizacji wskaźnika terapeutycznego niż na zmniejszeniu skutków ubocznych dla grupy.

Duże oczekiwania wzbudzają pochodne posiadające w pozycji C5 odwrócone grupy amidowe, jak również oksazolidynony mające w miejscu pierścienia C podstawiony pierścień azetydyny lub piperidyny, odpowiednio 3-alkilowe i 4-alkilowe podstawione pochodne. Przewidywania te wynikają z ograniczonego hamowania enzymu MAO-A oraz najbardziej korzystnego wpływu na efekt MPSi, równocześnie bez znacznego zmniejszenia aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu do linezolidu, jak również doskonałego profilu farmakokinetycznego wspomnianych pochodnych [56]. Duże, ale niespełnione nadzieje na przewyciężenie wewnętrznej oporności oksazolidynonów w stosunku do bakterii Gram-ujemnych wiązano z hybrydowymi oksazolidynonami. Uważa się, że głównym czynnikiem ograniczającym skuteczności hybryd wobec bakterii Gram-ujemnych jest utrudniona penetracja przez błonę zewnętrzną spowodowana zwiększoną masą cząsteczkową hybryd.

Wydaje się, że naukowcy nadal nie zsyntetyzowali takich pochodnych, które miałyby poszerzone spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, a mechanizm działania byłby odpowiednio selektywny i bezpieczny, ale należy wierzyć, że z każdą podjętą próbą osiągnięcie wyznaczonego celu staje się coraz bliższe.

H.2. Specjalne miejsce oksazolidynonów, które starałam się przedstawić w *rozdziale I* autoreferatu oraz w pracy **H.1**, szczególnie w kontekście ich możliwości terapeutycznych, pokładanych nadziei oraz dynamiki rozwoju był powodem zainteresowania tą klasą chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. Tedyzolid, kiedy badałam możliwości rozdzielania chiralnego enancjomerów (S)- i (R)- był na etapie badań klinicznych.

Celem pracy **H.2.** było opracowanie zasad rozdzielania związku optycznie czynnego tedyzolidu (R)-(TED) i jego enancjomeru (S)- przy użyciu obdarzonych ładunkiem pojedynczych izomerów, pochodnych cyklodekstryn stosując metodę cEKC. W celu określenia wpływu poszczególnych elementów struktury badanych związków na przebieg chiralnego różnicowania wobec zmieniających się warunków elektroforetycznych, zbadano zdolność rozdzielania enancjomerów TED, jak i linezolidu (LIN) równocześnie w tych samych warunkach. Obserwowano również selektywne oddziaływania CD z zsyntetyzowanymi prekursorami izomerów TED i LIN. Dzięki temu określono wpływ dodatkowych pierścieni piridyny (C) i tetrazolu (D) w cząsteczce

tedyzolidu oraz morfoliny (C) w cząsteczce linezolidu, a także odpowiednio grupy hydroksylowej i acetamidowej w pozycji C5 pierścienia oksazolidynowego z CDs, na mechanizm chiralnego różnicowania oksazolidynonów. Był to jedyny sposób, który na tym etapie ułatwił zrozumienie i interpretację mechanizmu rozdzielania, ponieważ CE nie daje możliwości wnikięcia w sam proces. Identyfikacja domen dla pochodnych oksazolidynonu odpowiedzialnych za oddziaływanie z selektorami chiralnymi stanowić może dodatkowy element dla zrozumienia procesu biologicznego wiązania leków z ich celem molekularnym.

W tym celu:

- zsyntetyzowano prekursory linezolidu i tedyzolidu;
- potwierdzono tożsamość prekursorów metodą NMR;
- dla prekursorów potwierdzono konfigurację metodą ECD;
- zoptymalizowano kluczowe parametry dla rozdzielania izomerów TED i LIN techniką cEKC; rodzaj i stężenie selektora chiralnego, wpływ dodatku modyfikatora organicznego w zależności od jego właściwości protycznych lub aprotycznych, skład elektrolitu podstawowego (BGE, ang. *background electrolyte*), temperaturę, przyłożone napięcie;
- obliczono efektywną ruchliwość enancjomerów, współczynnik selektywności (α), oraz znormalizowane wartości przepływu elektroosmotycznego (β) w zależności od stężenia selektora chiralnego;
- obliczono pozorną stałą tworzenia kompleksów metodą dopasowania krzywej nieliniowej.

Tedyzolid w zakresie pH 2-12 występuje jako nieobdarzony ładunkiem analit, dlatego wymaga stosowania cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem (CCD, ang. *charged cyclodextrins*) jako nośników w celu zróżnicowania ruchliwości elektroforetycznej powstałych kompleksów i dotarcia do detektora. Rolą cyklodekstryn, jako selektorów chiralnych jest zmiana nieselektywnej ruchliwości enancjomerów na różną efektywną ruchliwość elektroforetyczną, która jest wypadkową ruchliwości elektroforetycznej wolnego i skompleksowanego enancjomeru. Różnica w stabilności powstających kompleksów prowadzi do zróżnicowania ich czasów migracji. Enancjomer, który tworzy mniej trwały kompleks migruje szybciej.

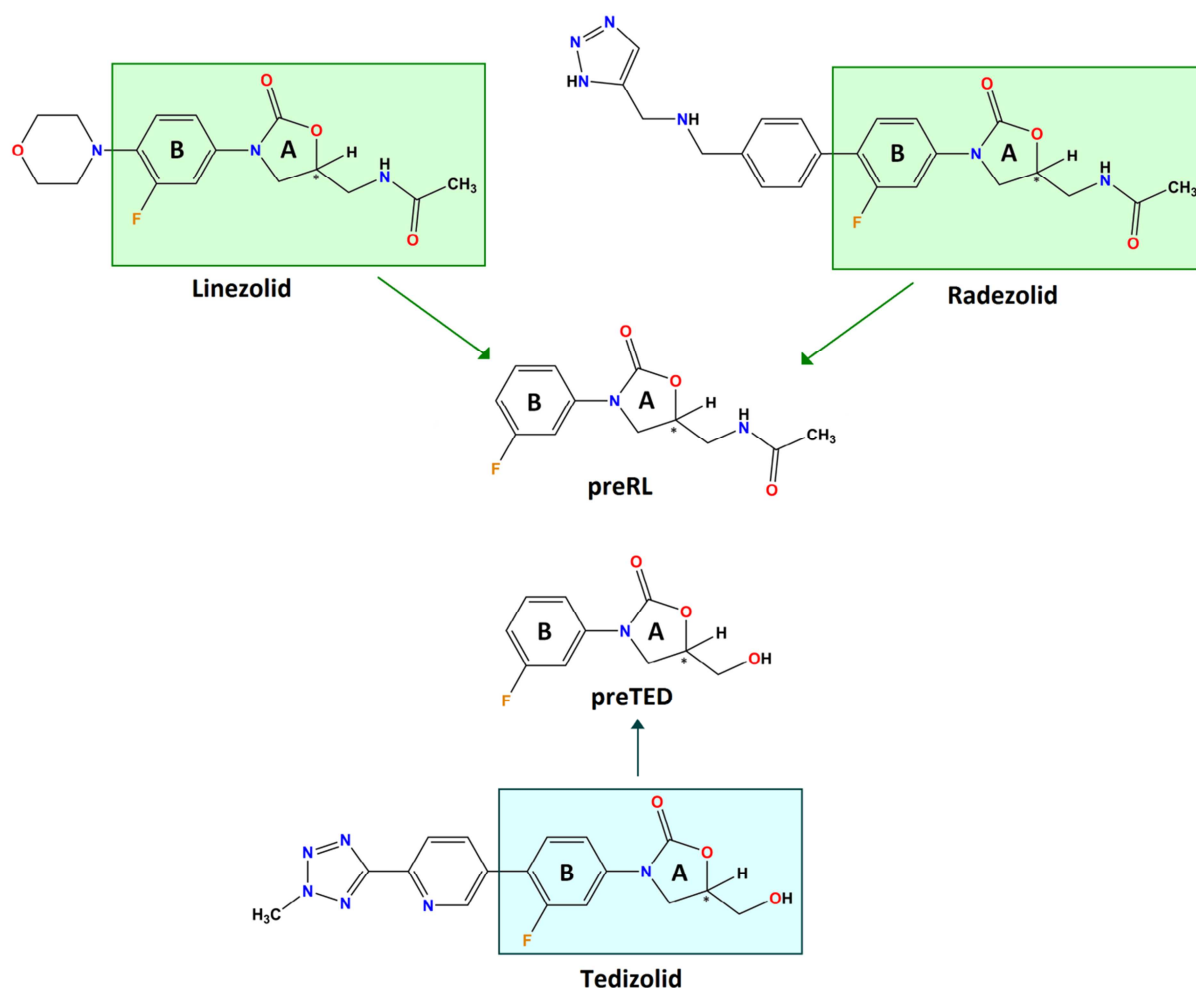
W trakcie opracowywania metody zastosowano: hydrofilowy anionowy pojedynczy izomer heptakis-(2,3-dihydroksy-6-sulfo)- β -CD (HS- β -CD), umiarkowanie

hydrofobowe CD, heptakis-(2,3-diacetylo-6-sulfo)- β -CD (HDAS- β -CD) i octakis-(2,3-diacetylo-7-sulfo)- γ -CD (ODAS- γ -CD) oraz hydrofobową cyklodekstrynę heptakis-(2,3-dimetylo-6-sulfo)- β -CD (HDMS- β -CD). Hydrofobowy HDMS- β -CD nie pozwolił na rozdzielanie enancjomerów LIN i TED, zarówno w BGE pozbawionym, jak i suplementowanym acetonitrylem (ACN). Natomiast hydrofilowy HS- β -CD, jako selektor chiralny nie pozwalał na chiralne rozróżnienie izomerów LIN, podczas gdy enancjomery TED zostały częściowo rozdzielone, jednakże dopiero po dodaniu modyfikatora organicznego do BGE. Jedynie cyklodekstryny z grupami acetylowymi podstawionymi w pozycjach C2 i C3 szerszej krawędzi toroidu zbudowanego z siedmiu (HDAS- β -CD) lub ośmiu (ODAS- γ -CD) jednostek glukopiranozy dodanych do BGE, pozwoliły na rozdzielanie enancjomerów tedyzolidu. Jednakże warunkiem koniecznym był dodatek modyfikatora organicznego. Biorąc pod uwagę, że oddziaływania jon-dipol są bardzo słabe w środowisku o wysokiej stałej dielektrycznej, jakim jest woda, rozważano wpływ rozpuszczalnika organicznego na zwiększenie interakcji międzycząsteczkowych pomiędzy analitem, a selektorem chiralnym. Dodatkowo rozpuszczalniki organiczne mając różne właściwości fizykochemiczne oferują dodatkowe możliwości sterowania selektywnością [57]. W związku z tym zmiana selektywności może być osiągnięta jedynie poprzez zmianę typu i stężenia rozpuszczalnika organicznego. W trakcie optymalizacji metody zastosowano zarówno amfiprotyczne, jak i protyczne rozpuszczalniki, tworząc środowisko wodno-organiczne. W tym celu zastosowano jako pierwszy ACN, aprotyczny rozpuszczalnik, pozbawiony właściwości przyjmujących lub dostarczających proton o niższej stałej dielektrycznej niż woda i stosunkowo małej lepkości, charakteryzujący się znaczącą ruchliwością elektroosmotyczną. Oceniano wpływ ACN w zakresie stężeń od 1 do 36% (v/v). Dodanie stosunkowo niewielkiej objętości ACN do BGE (37,5 mM HDAS- β -CD w buforze boranowym, pH 9,0) spowodowało częściowe rozdzielanie TED i jego enancjomeru (S)-, a dalsze zwiększanie stężenia ACN doprowadziło do zwiększenia rozdzielczości (R_s), ostatecznie uzyskując R_s , odpowiednio 2,8 i 1,8 dla par LIN i TED przy stężeniu 18,6% (v/v) ACN.

Zarówno dla izomerów LIN, jak i TED nie zaobserwowano odwrócenia kolejności migracji (EMO, ang. *enantiomer elution order*) w zależności od zastosowanego modyfikatora organicznego, jak i szerokości wnęki CD. Należy podkreślić, że zmiana buforu boranowego na bufor mrówczanowy, zdolny do działania jako donor protonu, doprowadziła do zwiększenia rozdzielczości izomerów TED z HDAS- β -CD. Stosując

bufor boranowy rozdzielanie izomerów TED zmniejszało się wraz ze wzrostem stężenia HDAS- β -CD, natomiast takiego efektu w przypadku HDAS- β -CD rozpuszczonego w buforze mrówczanowym nie obserwowano. Najlepsze wyniki rozdzielania enancjomerów TED uzyskano stosując metodę CD-cEKC; HDAS- β -CD (37,5 mM) rozpuszczony w buforze mrówczanowym (50 mM, pH 4,0) z dodatkiem acetonitrylu (18,6% v/v) w temperaturze 27 °C, stosując napięcie 12 kV; uzyskując rozdzielczość, $R_s = 5,0$ i $4,1$ odpowiednio dla pary enancjomerów linezolidu i tedyzolidu. Porównywalne efekty uzyskano stosując ODAS- γ -CD, jako selektor chiralny.

Wyznaczono stałe trwałości kompleksów dla każdej pary enancjomerów z HDAS- β -CD. W obliczeniach stałych nie zostały uwzględnione zmiany lepkości i siły jonowej buforu, które są bezpośrednio związane ze wzrostem stężenia obdarzonego ładunkiem selektora chiralnego dodawanego do BGE. Zmiany ruchliwości elektroforetycznych LIN i TED były monitorowane w funkcji zwiększającego się stężenia CD. Ogólnie, dla ujemnie naładowanych CDs im wyższa stała pozorna wiązania tym później odpowiedni enancjomer migruje. Stosownie do tego założenia para enancjomerów TED w warunkach buforu boranowego zachowywała się tak, jak tego oczekiwano, przy założeniu, że stechiometria utworzonych kompleksów jest 1:1. Natomiast w przypadku buforu mrówczanowego wartości obliczonych stałych nie były zgodne z ogólnym założeniem, zarówno dla TED, jak i LIN. Wartości stałych były trudne do interpretacji biorąc pod uwagę niską precyzję pomiarów i przyjęte założenie, że stechiometria badanego kompleksu jest 1:1. Z całą pewnością na podstawie uzyskanych wartości stałych można jednak przyjąć, że w buforze mrówczanowym zarówno TED, jak i LIN tworzą bardziej stabilne układy.



Rycina 2. Struktury molekularne linezolidu, radezolidu i tedyzolidu oraz ich prekursorów (preRL, preTED).

W celu określenia wpływu poszczególnych elementów struktury badanych związków na przebieg chiralnego różnicowania porównano zachowanie zsyntetyzowanych prekursorów TED i LIN w stosunku do ich produktów końcowych, tedyzolidu i linezolidu oraz porównano zachowanie samych prekursorów względem siebie. Interesujące jest zachowanie zsyntetyzowanych prekursorów tedyzolidu, które zbudowane są jedynie z pierścieni A i B (pozbawione pierścieni C i D) z grupami hydroksymetylowymi w pozycji C5 (jak przedstawiono to schematycznie na **rycinie 2**), które nie były nawet częściowo rozdzielane przy użyciu HS- β -CD (sam tedyzolid, tak), ale rozdzielono je stosując HDAS- β -CD bez dodatku ACN. Natomiast w przypadku cząsteczki TED warunkiem koniecznym do rozdzielania enancjomerów TED był dodatek modyfikatora organicznego, co dostarcza dowodów na to, że pierścienie C i D w cząsteczce tedyzolidu mają istotny wpływ na enancjoselektywne oddziaływanie z selektorem chiralnym. Druga para zsyntetyzowanych izomerów prekursora LIN, nie

została rozdzielona przy użyciu samego HDAS- β -CD i warunkiem koniecznym był dodatek ACN do buforu rozdzielającego. Ten wynik był zaskakujący, ponieważ wcześniejsze wyniki wykazały, że LIN i jego izomer nie wymagają dodatku organicznego rozpuszczalnika. Co więcej, nie zaobserwowano wpływu rozpuszczalników organicznych na rozdział cząsteczki linezolidu na całym etapie optymalizacji metody. Co świadczy również o tym, że pierścień morfolinowy odgrywa rolę w chiralnym rozróżnianiu izomerów linezolidu.

Natomiast różnica w zachowaniu obu prekursorów, pierwszego z podstawnikiem hydroksymetylowym i drugiego z podstawnikiem metylacetamidowym, polegająca na konieczności dodatku ACN do BGE (w przypadku tego drugiego), dotyczy różnicy w oddziaływaniu podstawnika w pozycji C5 pierścienia oksazolidynonu z CD, w miejscu, które jest stereochemicznie zależne od konfiguracji centrum chiralnego danego enancjomeru. W obu przypadkach aktywne izomery (*R*)-TED i (*S*)-LIN, zarówno dla grupy hydroksymetylowej i metylacetamidowej mają tak samo przestrzennie zorientowany podstawnik, tą samą strukturę przestrzenną, pomimo różnego zapisu ich konfiguracji. Konieczność dodatku ACN podyktowana była najprawdopodobniej właściwościami samego podstawnika w pozycji C5.

Metody mechaniki kwantowej, ani półempiryczne metody modelowania molekularnego oparte na pomiarach dynamiki molekularnej, na tym etapie nie są w stanie odpowiedzieć na pytanie dotyczące wpływu ACN na rozróżnienie powstających kompleksów supramolekularnych izomerów tedyzolidu z CCD.

H.3. Rola różnych metod spektroskopowych w analizie identyfikacyjnej związku optycznie czynnego, tedyzolidu.

W tym celu:

- zastosowano metody spektralne: w podczerwieni FT-IR (2000 - 400 cm^{-1}) oraz widma rozpraszania Ramana (2000 - 400 cm^{-1}); w interpretacji widm wykorzystano porównanie z widmami teoretycznymi otrzymanymi w wyniku obliczeń kwantowo-chemicznych z zastosowaniem teorii funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *density functional theory*) z potencjałem hybrydowym B3LYP z użyciem bazy funkcyjnej 6-311G (2df, 2pd);
- potwierdzono konfigurację, przeprowadzono badanie czystości enancjomerycznej na podstawie analizy widm ECD;

- wyznaczono teoretyczne różnice energii między najwyższym obsadzonym orbitalem molekularnym (HOMO, ang. *highest occupied molecular orbital*) i najniższym nieobsadzonym orbitalem molekularnym (LUMO, ang. *lowest unoccupied molecular orbital*), dla określenia przesunięcia ładunku pomiędzy dwoma enancjomerami tedyzolidu z użyciem matematycznych metod obliczeniowych;
- wyznaczono mapy potencjału elektrostatycznego (MEP, ang. *molecular electrostatic potentials*) obliczone metodą DFT dla obydwu enancjomerów.

Dla szczegółowej identyfikacji pasm wibracyjnych widm FT-IR i Ramana dla tedyzolidu, wyodrębniono następujące domeny: grupę hydroksymetylową (I), pierścień 1,3-oksazolidyn-2-onu (II), biaryl (pirydyn-3-ylo)-3-fluorofenyłowy (III) oraz strukturę 2-metylo-2*H*-tetrazol-5-yłu (IV).

W widmie ECD (S)-TED oznaczono dwa maksima absorpcyjne przy 206,6 i 299,0 nm. W porównaniu do widma (S)-tedyzolidu w widmie ECD (R)-TED, obserwujemy niewielkie przesunięcie hipsochromowe dla pierwszego maksimum przy 207,2 nm i batochromowe dla drugiego maksimum przy 300,8 nm. Ponadto, porównując widma obu enancjomerów, zaobserwowano różnice w kształcie widm, zwłaszcza w zakresie 200÷260 nm. Powyższe obserwacje wskazują, że jeden z enancjomerów TED zawiera zanieczyszczenia w strukturze chromoforowej. Potwierdziły to także widma FT-IR i Ramana w zakresie 650÷600 cm⁻¹ oraz 1180 cm⁻¹, jak również różnice w intensywności dla pasm położonych przy 1290 i 1320 cm⁻¹. Wszystkie obserwowane zmiany w pozycji, kształcie i intensywności pasm odpowiadają: drganiom zginającym wiązań C–C–C w pierścieniu fenyłowym, drganiom rozciągającym wiązań C–F, C–C i C–N, oraz drganiom wachlarzowym wiązań C–H pierścieni pirydyny i tetrazolu.

Zgodnie z oczekiwaniami, po przeanalizowaniu kształtów orbitali HOMO-LUMO, nie obserwowano różnic w rozkładzie elektronów dla obu enancjomerów TED. Domena zdolna do przyjmowania i oddawania elektronów znajduje się w strukturach zawierających elektrony π , takich jak pirydyn-3-ylo-3-fluorofenyłowej i 2-metylo-2*H*-tetrazol-5-yłowej. Co ciekawe, trendy w ich pionowym i poziomym rozmieszczeniu były obserwowane odpowiednio dla HOMO i LUMO. Na podstawie różnic wartości pomiędzy energiami HOMO i LUMO, można przewidzieć najbardziej reaktywną pozycję w układach elektronów π i wyjaśnić kilka rodzajów reakcji [58]. Zgodnie z oczekiwaniami obliczenia różnicy pomiędzy energiami dla obu enancjomerów TED wykazały brak

istotnych różnic dla tych wartości, co potwierdza taką samą chemiczną reaktywność i stabilność obu enancjomerów.

Mapy MEP są przydatne do przewidywania miejsc wiążących, podatnych na atak elektrofilowy lub nukleofilowy. Zmiana w elektrostatycznych potencjałach jest w dużej mierze odpowiedzialna za wiązanie leków do tzw. punktów uchwytu warunkujących ich farmakologiczne działanie [59, 60]. Jak wspomniano poprzednio, konfiguracja 5(*R*)- w pierścieniu 1,3-oksazolidyn-2-onu jest niezbędna do działania przeciwbakteryjnego TED. Różnice w mapach MEP zaobserwowano dokładnie dla struktury - 1,3-oksazolidyn-2-onu, co może być związane z jej działaniem przeciwbakteryjnym, ponieważ struktura 1,3-oksazolidynonu z grupą hydroksymetylową jest odpowiedzialna za aktywność wobec szczepów posiadających gen *cfr*. Dodatkowo obserwowano niewielkie zmiany lokalizacji elektronów dla enancjomerów (*R*)- i (*S*)-TED pomiędzy pierścieniami pirydyny i tetrazolu. Mogą być one związane z różnicami w ich zdolności do tworzenia dodatkowych oddziaływań wiążących z PTC podjednostki 50S rybosomu.

H.4. Celem pracy było opracowanie zasad rozdzielania związku optycznie czynnego (*S*)-radezolidu (RAD) i jego enancjomeru (*R*)- przy użyciu obdarzonych ładunkiem pojedynczych izomerów, pochodnych CDs stosując metodę cEKC. W celu określenia wpływu struktury badanych związków wobec zmieniających się warunków elektroforetycznych zbadano możliwość rozdzielania chiralnych izomerów RAD, jak i linezolidu (LIN) równocześnie w tych samych warunkach. Obserwowano również selektywne oddziaływania CDs z zsyntetyzowanymi prekursorami izomerów RAD i LIN, poprzez obserwacje wpływu dodatkowych pierścieni fenylu (C) i triazolu (D) w cząsteczce radezolidu oraz morfoliny (C) w cząsteczce linezolidu na chiralne rozróżnienie.

W tym celu:

- zsyntetyzowano (*R*)-radezolid - niedostępne komercyjnie chiralne zanieczyszczenie (*S*)-RAD;
- potwierdzono tożsamość (*R*)-radezolidu metodą NMR;
- potwierdzono konfigurację (*S*)- i (*R*)-RAD metodą ECD;
- zoptymalizowano kluczowe parametry dla rozdzielania izomerów RAD i LIN techniką cEKC; rodzaj i stężenie selektora chiralnego, skład i wartość pH BGE, wpływ dodatku modyfikatora organicznego w zależności od jego właściwości protycznych lub aprotycznych, temperaturę oraz przyłożone napięcie;

- obliczono efektywną ruchliwość enancjomerów, współczynnik selektywności (α), oraz znormalizowane wartości przepływu elektroosmotycznego (β) w zależności od stężenia selektora chiralnego;
- wykonano pomiary ECD dla kompleksów supramolekularnych w warunkach zmieniających się warunków: temperatury (10 °C – 90 °C) oraz wzrastającego stężenia ACN (0 – 40%) dla elektrolitu podstawowego o niskiej wartości pH;
- obliczono pozorną stałą tworzenia kompleksów i określono stechiometrię tworzonego kompleksu metodą dopasowania krzywej nieliniowej dla enancjomerów RAD i LIN w zależności od wartości pH (2,5, 6,6 oraz 8,2) BGE.

Udowodniono, że w przypadku protonowania atomu azotu, w łączniku metyloaminowym (w niskim pH), dochodzi do powstawania bardzo silnych oddziaływań ze wszystkimi badanymi CD: HS- β -CD, HDAS- β -CD, HDMS- β -CD. Jednakże oddziaływania te są niestereoselektywne. Aby móc zróżnicować enancjomery RAD w środowisku o niskim pH należało osłabić stosunkowo silne oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanym RAD, a ujemnie naładowaną CD. W przypadku HDAS- β -CD wzrost temperatury w zakresie 17 °C - 57 °C spowodował częściowe rozdzielanie enancjomerów RAD, przeciwnie niż w przypadku izomerów LIN, gdzie rozdzielczość pomiędzy izomerami rosła wraz ze spadkiem temperatury. Ten niezwykle wpływ temperatury, sprzeczny z zasadami termodynamiki, jest zgodny z obserwacjami przeprowadzonymi przez Westalla i wsp. [61], którzy wnioskowali, że jeżeli stężenie CD przekracza stężenie, w którym uzyskiwana jest maksymalna różnica w pozornej ruchliwości, wówczas enancjoseparacja izomerów rośnie, gdy oddziaływania między selektorem, a gościem zostaną osłabione, tak jak to miało miejsce w przypadku izomerów RAD z HDAS- β -CD, gdy temperatura wzrastała.

W przypadku oddziaływania RAD z HDMS- β -CD w niskim pH efekt taki obserwowano po dodaniu ACN do BGE. W tym przypadku również należało osłabić silne oddziaływania niestereoselektywne. Po dodaniu ACN do BGE obserwowano zachowanie podobne do zachowania izomerów RAD z HDAS- β -CD w wysokich temperaturach. Gdy stężenie selektora wykraczało poza optymalną wartość, dodanie rozpuszczalnika organicznego zwiększyło selektywność, poprzez osłabienie oddziaływań niestereoselektywnych pomiędzy analitem a selektorem [62]. Za najkorzystniejszy rozdział, kierując się założeniami chromatograficznymi, które przyjmują, że zanieczyszczenie eluuje przed pikiem głównym, uznano warunki

doświadczalne: bufor fosforanowy (50 mM) z HDMS- β -CD (40 mM) suplementowany 35% (v/v) ACN przy odwróconej polaryzacji elektrod (RP).

Ponieważ CE nie jest w stanie dostarczyć żadnych bezpośrednich informacji o geometrii powstających kompleksów, w tym celu przeprowadzono pomiary z wykorzystaniem ECD dla wybranych kompleksów w buforach o niskim pH. Porównano intensywności i przesunięcia pasm w funkcji zależności od temperatury lub zwiększającego stężenia ACN, stosując odpowiednio HDAS- β -CD i HDMS- β -CD. Porównując widma ECD dla RAD przy braku środka rozdzielającego w stosunku do widm RAD z selektorem chiralnym, zaobserwowano zmiany w widmach ECD spowodowane powstaniem efektu Cottona. Najbardziej intensywny efekt obserwowano w obecności HDAS- β -CD i został on przypisany silniejszym oddziaływaniom RAD z HDAS- β -CD niż z HDMS- β -CD, co pozostaje w zgodzie z obliczonymi wartościami stałych tworzenia kompleksu.

Podwyższenie temperatury lub dodanie ACN prowadziło do osłabienia oddziaływań międzycząsteczkowych, co potwierdził spadek wartości molowej eliptyczności. W pomiarach zależnych od temperatury, molowa eliptyczność zmieniała się w zakresie $[\theta]$ od 6991 do 1096 [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$], odpowiednio dla 10 i 90 °C, przy 272 $\pm$ 2 nm, podczas gdy dla pomiarów zależnych od ACN molowa eliptyczność zmieniała się w zakresie $[\theta]$ od -794 do -272 [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$], odpowiednio dla 0% i 40% ACN, przy 272,6 nm. Widma RAD z HDMS- β -CD różniły się od tych, które uprzednio obserwowano dla RAD z HDAS- β -CD, wskazując na różną geometrię procesu kompleksowania RAD w przypadku dwóch użytych CD. W obu przypadkach założono powstanie kompleksów inkluzyjnych. Dodatni indukowany efekt Cottona przy długości fali 272 nm dla RAD z HDAS- β -CD, wskazuje, że układ bifenylowy cząsteczki RAD jest ułożony równolegle do osi wnęki CD. I odwrotnie, RAD z HDMS- β -CD jest usytuowany prostopadłe do osi symetrii CD, z powodu ujemnego efektu Cottona przy 272 nm [63, 64]. Jednakże tendencja ta ulegnie odwróceniu, jeśli przyjmie się inne założenie dotyczące oddziaływań, nie wewnętrznych, a zewnętrznych, wówczas dodatni indukowany sygnał zostanie przypisany orientacji prostopadłej, a ujemny ułożeniu równoległemu.

Obserwacja interakcji prekursorów RAD i LIN (preRL) z HDMS- β -CD w BGE przy niskich wartościach pH potwierdza hipotezę o wpływie temperatury i dodatku ACN na chiralną separację enancjomerów RAD. Dodatkowy pierścień morfolinowy połączony z prekursorem preRL, jak w LIN, blokuje różnicowanie pary izomerów za pomocą HDMS-

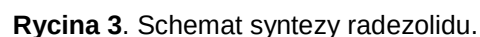
β -CD, podobnie, zmieniając podstawnik metylacetamidowy na hydroksymetylowy, HDMS- β -CD jest również nieskuteczny. Z drugiej strony, dodatkowy pierścień triazolowy połączony poprzez alifatyczny łącznik z ugrupowaniem bifenylowym (jak w RAD) dostarcza dowodów na to, że taka struktura umożliwia chiralne odróżnienie RAD przez HDMS- β -CD. Co potwierdza, że dodatkowe pierścienie C i D są zaangażowane w chiralne różnicowanie izomerów RAD przez HDMS- β -CD.

Natomiast drugi selektor chiralny, HDAS- β -CD okazał się najbardziej selektywny wobec izomerów, pochodnych oksazolidynonów, ponieważ dzięki niemu udało się zróżnicować ruchliwość elektroforetyczną par enancjomerów, zarówno RAD, jak i LIN, prekursorów RAD/LIN i TED oraz TED, choć w ostatnim przypadku konieczny był dodatek ACN.

Wyznaczono stałe tworzenia kompleksów dla par izomerów LIN i RAD w pH 2,5, 6,6 i 8,2 oraz stechiometrię kompleksów, która w przypadku LIN jest 1:1, natomiast dla RAD wyniosła 1:1 oraz 1:2 w stosunku „gość:gospodarz”.

H.5. i H.6. Celem było potwierdzenie tożsamości radezolidu i jego kluczowych półproduktów otrzymanych na drodze enancjoselektywnej syntezy z zastosowaniem chiralnego syntonu, jako wyjściowego bloku budulcowego z wykorzystaniem metod spektralnych. Zsyntetyzowany radezolid został wykorzystany następnie na etapie opracowania zasad chiralnego rozdzielania za pomocą cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem, metodą kapilarnej chromatografii elektrokinetycznej.

Schemat przeprowadzonej syntezy (S)-radezolidu przedstawiono poniżej na **rycinie 3**. W tekście czcionką pogrubioną zaznaczono odpowiednie półprodukty syntezy, które należy powiązać z odpowiednią strukturą na rycinie.



Dla bardziej dokładnej analizy, a także z powodu braku materiałów odniesienia dla produktów pośrednich, analiza wibracyjna została wzmocniona metodami obliczeniowymi chemii kwantowej w oparciu o teorię DFT z wykorzystaniem metody

potencjału hybrydowego B3LYP przy bazie funkcyjnej 6-311G (d, p). Zaobserwowano dobrą zgodność widm doświadczalnych i teoretycznych.

Dlatego podczas identyfikacji półproduktów i radezolidu, jako produktu końcowego z powodzeniem zastosowano:

- metody spektralne, widma w podczerwieni FT-IR (4000 - 100 cm^{-1}) oraz widma rozpraszania Ramana (4000 - 100 cm^{-1}); w interpretacji których wykorzystano metodę teorii funkcjonałów gęstości, DFT z bazowym funkcjonałem hybrydowym B3LYP z użyciem bazy funkcyjnej 6-311G (2df, 2pd);
- dokonano oceny czystości enancjomerycznej RAD na podstawie analizy widm ECD;
- przypisano przesunięcia chemiczne dla jednowymiarowych widm ^1H i ^{13}C NMR (w D_2O , $\text{DMSO}-d_6$), wartości stałych sprzężenia spinowo-spinowego dla homo- i heteroatomów oraz przeprowadzono analizę widm dwuwymiarowych COSY, ^1H $\{^{13}\text{C}\}$ HSQC i ^1H $\{^{13}\text{C}\}$ HMBC przy wsparciu obliczeń teoretycznych;
- przeprowadzono analizę dla pary orbitali granicznych (FMOs, ang. *frontier molecular orbitals*) HOMO-LUMO, która posłużyła następnie do określenia przesunięcia ładunku dla dwóch enancjomerów RAD, stosując metody obliczeniowe;
- wykonano mapy potencjału elektrostatycznego (MEP) obliczone metodą DFT dla obydwu enancjomerów radezolidu.

Wobec tego, że działanie farmakologiczne obserwuje się tylko dla enancjomeru (S)-radezolidu, jego synteza jest zorientowana na uzyskiwanie pojedynczego izomeru o wymaganej czystości i pożądanej konfiguracji optycznej. Dlatego też scharakteryzowano półprodukty syntezy (S)-RAD stosując ^1H i ^{13}C NMR, a także korelację 2D HSQC i HMBC (**2**, **5**, **9**, **10**, **12**), dodatkowo scharakteryzowano pasma wibracyjne FT-IR, rozproszenia Ramana (**3**, **5**, **9**, **12**) oraz widma ECD (**5**, **12**). Każda technika zapewnia unikatowy i konkretny zestaw informacji. Pełną widmową charakterystykę kluczowych półproduktów otrzymanych w drodze syntezy z użyciem homochiralnego bloku budulcowego porównano w stosunku do produktu gotowego (**12**).

Dla szczegółowej identyfikacji radezolidu, wyodrębniono następujące domeny: pierścień triazolowy, łącznik metyloaminometylowy, bifenyl (pierścienie fenylowy i 2-fluorofenylowy), pierścień oksazolidynowy i podstawnik metylacetamidowy.

W celu potwierdzenia braku inwersji w centrum chiralnym na kluczowym etapie syntezy polegającym na zamknięciu pierścienia oksazolidynonu, porównano widma ECD dla pary zsyntetyzowanych prekursorów zawierających grupę hydroksymetylową w pozycji C5 pierścienia oksazolidynonu - (S)- i (R)-enancjomerów (**5**). Zarejestrowane widma dla pary enancjomerów były swoimi odbiciami lustrzanymi. Dla izomeru (R)- (**5**), który prowadzi do otrzymania produktu końcowego (S)-RAD (**12**), obserwowano dodatni efekt Cottona przy 191,6 nm, a ujemny przy 203,4, 236,8 i 275,4 nm. Następnie porównano widma ECD dla zsyntetyzowanego produktu końcowego (**12**) wobec materiału referencyjnego. Różnice pomiędzy widmami nie były znaczące, co potwierdza właściwą czystość chiralną zsyntetyzowanego izomeru (S)-RAD. RAD wykazał maksima pasm absorpcyjnych przy 185,0 w stosunku do 183,6 nm, 268,0 w stosunku do 258,3 nm, a także ujemne przy 212,4 względem 213,3 nm, odpowiednio dla zsyntetyzowanego produktu (S)- i materiału odniesienia. Wskazuje to, że zsyntetyzowany RAD nie zawierał zanieczyszczeń w strukturze chromoforowej cząsteczki. Jeśli badana próbka byłaby zanieczyszczona, wówczas obserwowano by zmiany położenia maksimum pasma absorpcyjnego i kształtu widma. Jedynie przesunięcie maksimum dla pasma przy 260 nm o około 10 nm wobec widma materiału odniesienia może wskazywać na różnicę zsyntetyzowanego (S)-RAD wobec materiału odniesienia. Jednakże przesunięcie to było obserwowane dla poszerzonego pasma o niższej absorbancji, stąd najprawdopodobniej różnica w wyznaczeniu położenia maksimum dla pasma absorpcyjnego. Analiza porównawcza widma wskazuje na wysoki poziom zgodności z materiałem referencyjnym. Co ważne, Okuom i wsp. [67] przedstawili jakościową ocenę czystości chiralnej wykorzystując technikę ECD. Wykreślono widma ECD dla obu enancjomerów i wyznaczono molowy różnicowy współczynnik absorpcji ($\Delta\epsilon$) dla każdego enancjomeru przy maksimum długości fali. W tym celu potrzebne są jednak odpowiednie ilości materiałów referencyjnych dla obu izomerów (S)- i (R)-. W naszych badaniach nie dysponowano materiałem odniesienia, (R)-RAD i z tego względu nie możliwe było przeprowadzenie eksperymentu zaproponowanego przez Okuom i wsp. [67]. Porównano zsyntetyzowany (S)-RAD do materiału odniesienia i w oparciu o zgodność widm wnioskowano o czystości chiralnej zsyntetyzowanego związku.

W pracy **H.6** przedstawiono widma wielowymiarowe, $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}\text{HSQCAD}$ dla części alifatycznej i aromatycznej związku, **10**, najbardziej kluczowego etapu syntezy radezolidu.

Najważniejsze osiągnięcia uzyskane w cyklu publikacji stanowiących dorobek habilitacyjny i wnioski płynące z badań

1. W pracy **H.1.** dokonano przeglądu piśmiennictwa i zgłoszeń patentowych z zakresu syntezy oraz badań przedklinicznych nowych pochodnych z klasy oksazolidynonów obejmując swym zakresem lata 2006 – 2012, wskazując kierunki rozwoju dla tej klasy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i zwracając uwagę na pochodne posiadające w pozycji C5 odwrócone grupy amidowe, jak również oksazolidynony mające w miejscu pierścienia C podstawiony pierścień azetydyny lub piperydyny. Przedstawiona tematyka badań cieszy się dużym zainteresowaniem badaczy, o czym świadczy liczba cytowań, $n=50$, od roku 2013.
2. W pracy **H.2.:**
 - potwierdzono wpływ czynnika achiralnego na chiralne różnicowanie enancjomerów TED. Dodanie stosunkowo niewielkiej objętości ACN do BGE (37,5 mM HDAS- β -CD w buforze boranowym, pH 9,0) spowodowało częściowe rozdzielenie TED i jego enancjomeru (S)-, a dalsze zwiększanie stężenia ACN doprowadziło do zwiększenia rozdzielczości (R_s), ostatecznie uzyskując R_s , odpowiednio 2,8 i 1,8 dla par enancjomerów LIN i TED przy stężeniu 18,6% (v/v) ACN;
 - udowodniono, że zmiana jednego z achiralnych składników BGE - buforu boranowego na bufor mrówczanowy, zdolny do działania jako donor protonu, doprowadziła do zwiększenia rozdzielczości izomerów TED w buforze z HDAS- β -CD w porównaniu do buforu boranowego, a wyznaczone stałe trwałości kompleksów dla każdej pary enancjomerów z HDAS- β -CD potwierdziły, że w buforze mrówczanowym zarówno TED, jak i LIN tworzą bardziej stabilne układy;
 - zsyntetyzowane prekursor linezolidu i tedyzolidu, co było oryginalnym podejściem do rozwiązania problemu badania mechanizmu rozdzielania chiralnego i próbą odpowiedzi na pytanie dotyczące wpływu poszczególnych elementów struktury oksazolidynonów na proces enancjoróżnicowania, dostarczyły dowodów na to, że pierścienie C i D w cząsteczce tedyzolidu mają istotny wpływ na enancjoselektywne oddziaływanie z selektorem

chiralnym oraz, że pierścień morfolinowy odgrywa rolę w chiralnym rozróżnianiu izomerów linezolidu.

3. W pracy **H.3.** dla TED wykonano analizę identyfikacyjną związku metodami spektroskopowymi, FT-IR i rozpraszaniem Ramana. W efekcie przeprowadzonych badań zdefiniowana została geometria pierwotna TED, kształt i rozmieszczenie elektronów na orbitalach HOMO-LUMO oraz molekularny potencjał elektrostatyczny. W oparciu o wartość energii przejść pomiędzy orbitalami HOMO-LUMO oszacowano reaktywność oraz prawdopodobieństwo możliwych oddziaływań dla TED na poziomie molekularnym.
4. W pracy **H.4.**:
 - udowodniono, że w przypadku protonowania atomu azotu, w łączniku metyloaminowym (w niskim pH), dochodzi do powstania bardzo silnych oddziaływań ze wszystkimi badanymi CD: HS- β -CD, HDAS- β -CD, HDMS- β -CD. Jednakże oddziaływania te są niestereoselektywne. Aby móc zróżnicować enancjomery RAD w środowisku o niskim pH należało osłabić stosunkowo silne oddziaływania elektrostatyczne, poprzez wzrost temperatury w przypadku zastosowania HDAS- β -CD oraz wzrost stężenia ACN w przypadku HDMS- β -CD;
 - dla chiralnego rozdzielania radezolidu za najkorzystniejszy rozdział, uznano warunki doświadczalne: bufor fosforanowy (50 mM) z HDMS- β -CD (40 mM) suplementowany 35% (v/v) ACN przy odwróconej polaryzacji elektrod;
 - zastosowano dichroizm kołowy do wyjaśnienia geometrii powstających kompleksów supramolekularnych, jako technikę komplementarną do cEKC. Pomiar z wykorzystaniem ECD dla wybranych kompleksów w buforach o niskim pH udowodniły, że podwyższenie temperatury lub dodanie ACN prowadziło do osłabienia oddziaływań międzycząsteczkowych, co potwierdził spadek wartości molowej eliptyczności. Widma RAD z HDMS- β -CD różniły się od tych, które uprzednio obserwowano dla RAD z HDAS- β -CD, wskazując na różną geometrię procesu kompleksowania RAD w przypadku dwóch użytych CCD. W obu przypadkach założono powstanie kompleksów inkluzyjnych. Dodatni indukowany efekt Cottona przy długości fali 272 nm dla RAD z HDAS- β -CD, wskazuje, że układ bifenylowy cząsteczki RAD jest ułożony równolegle do osi wnęki CD. I odwrotnie, RAD z HDMS- β -CD jest

usytuowany prostopadle do osi symetrii CD, z powodu ujemnego efektu Cottona przy 272 nm;

- obserwacja interakcji prekursorów RAD i LIN (preRL) z HDMS- β -CD w BGE przy niskich wartościach pH potwierdza hipotezę o wpływie temperatury i dodatku ACN na chiralne rozdzielanie enancjomerów RAD. Dodatkowy pierścień morfolinowy połączony z prekursorem preRL, jak w LIN, blokuje różnicowanie pary izomerów za pomocą HDMS- β -CD, podobnie, zmieniając podstawnik metylacetamidowy na hydroksymetylowy, HDMS- β -CD jest również nieskuteczny. Z drugiej strony, dodatkowy pierścień triazolowy połączony poprzez alifatyczny łącznik z ugrupowaniem bifenylowym (jak w RAD) dostarcza dowodów na to, że taka struktura umożliwia chiralne odróżnienie RAD przez HDMS- β -CD. Co potwierdza, że dodatkowe pierścienie C i D są zaangażowane w chiralne różnicowanie izomerów RAD przez HDMS- β -CD;
 - wyznaczono stałe trwałości kompleksów dla par izomerów LIN i RAD w pH 2,5, 6,6 i 8,2 oraz stechiometrię kompleksów, która w przypadku LIN wyniosła 1:1, natomiast dla RAD wyniosła 1:1 oraz 1:2 w stosunku „gość:gospodarz”.
5. Identyfikacja domen dla pochodnych oksazolidynonu odpowiedzialnych za interakcje z selektorami chiralnymi, tak jak zostało to przedstawione w pracach **H.2.** i **H.4.**, stanowi istotny element w odniesieniu do wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania tych leków z ich celem molekularnym.
6. W pracy **H.5.** i **H.6.** scharakteryzowano półprodukty syntezy (S)-RAD stosując ^1H i ^{13}C NMR, a także korelację 2D HSQC i HMBC (**2, 5, 9, 10, 12**), scharakteryzowano pasma wibracyjne FT-IR, rozproszenia Ramana (**3, 5, 9, 12**) oraz widma ECD (**5, 12**). Dla bardziej dokładnej analizy, a także z powodu braku materiałów odniesienia dla produktów pośrednich, analiza wibracyjna została oparta na metodach obliczeniowych chemii kwantowej w oparciu o teorię DFT z wykorzystaniem metody potencjału hybrydowego B3LYP przy bazie funkcyjnej 6-311G (d, p). Zaobserwowano dobrą zgodność widm doświadczalnych i teoretycznych.

Piśmiennictwo

- [1] Raport Światowej Organizacji Zdrowia „Oporność drobnoustrojów na antybiotyki: raport podsumowujący monitorowanie antybiotykoodporności na Świecie w 2014 r.” biuletyn, Aktualności narodowego programu ochrony antybiotyków, 2 (2014) 1-5.
- [2] Gregory, W. A. U.S. Patent 4,461,773, 1984.
- [3] Swaney, S. M.; Aoki, H.; Ganoza, M. C.; Shinabarger, D. L., The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 42 (1998) 3251-3255.
- [4] Wilson, D. N.; Schlunzen, F.; Harms, J. M.; Starosta, A. L.; Connell, S. R.; Fucini, P., The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 (2008) 13339-13344.
- [5] Leach, K. L.; Swaney, S. M.; Colca, J. R.; McDonald, W. G.; Blinn, J. R.; Thomasco, L. M.; Gadwood, R. C.; Shinabarger, D.; Xiong, L. Q.; Mankin, A. S., The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria, *Mol. Cell*, 26 (2007) 393-402.
- [6] Ippolito, J. A.; Kanyo, Z. F.; Wang, D.; Franceschi, F. J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A.; Duffy, E. M., Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit, *J. Med. Chem.*, 51 (2008) 3353-3356.
- [7] Marks J.; Kannan K.; Roncase E. J.; Klepacki D.; Kefi A.; Orelle C.; Vázquez-Laslop N.; Mankin A. S., Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center, *PNAS*, 113 (2016) 12150-12155.
- [8] Tsiodras, S.; Gold, H. S.; Sakoulas, G.; Eliopoulos, G. M.; Wennersten, C.; Venkataraman, L.; Moellering, R. B. Jr.; Ferraro, M. J., Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*, *Lancet*, 358 (2001) 207-208.
- [9] Toh, S.; Xiong, L.; Arias, C. A.; Villegas, V.; Lolans, K.; Quinn, J.; Mankin, A. S., Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid, *Mol. Microbiol.*, 64 (2007) 1506-1514.
- [10] Gonzales, R. D.; Schreckenberger, P. C.; Graham, M. B.; Kelkar, S.; Den-Besten, K.; Quinn, J. P., Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid, *Lancet*, 357 (2001) 1179.
- [11] Renslo, A. R., Antibacterial oxazolidinones: emerging structure-toxicity relationships, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 8 (2010) 565-574.
- [12] <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=radezolid>.

- [13] Shaw, K. J.; Barbachyn, M. R., The oxazolidinones: past, present, and future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1241 (2011) 48-70.
- [14] Villemagne, B.; Crauste, C.; Flipo, M.; Baulard, A. R.; Déprez, B.; Willand, N., Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance, *Eur. J. Med. Chem.*, 51 (2012) 1-16.
- [15] Zappia, G.; Menendez, P.; Monache, G. D.; Misiti, D.; Nevola, L.; Botta, B., The contribution of oxazolidinone frame to the biological activity of pharmaceutical drugs and natural products, *Mini. Rev. Med. Chem.*, 7 (2007) 389-409.
- [16] Valente, S.; Tomassi, S.; Tempera, G.; Saccoccio, S.; Agostinelli, E.; Mai, A., Novel reversible monoamine oxidase A inhibitors: highly potent and selective 3-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-2-oxazolidinones, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 8228-8232.
- [17] Macherla, V. R. R.; Nicholson, B.; Lam, K. S. U.S. Patent 7879,892 B2, 2011.
- [18] Tadesse, M.; Svenson, J.; Jaspars, M.; Strøm, M. B.; Abdelrahman, M. H.; Andersen, J. H.; Hansen, E.; Kristiansen, P. E.; Stensvåg, K.; Haug, T., Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities, *Tetrahedron Lett.*, 52 (2011) 1804-1806.
- [19] Rapposelli, S.; Da Settimo, F.; Digiaco, M.; La Motta, C.; Lapucci, A.; Sartini, S.; Vanni, M., Synthesis and biological evaluation of 2-oxo-2,3-dihydro-3*H*-spiro[chromene-4,5-[1,3]oxazolidin]-3'yl]acetic acid derivatives as aldose reductase inhibitors, *Archiv. der Pharmazie*, 344 (2011) 372-385.
- [20] Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R., 1,2-amino alcohols and their heterocyclic derivatives as chiral auxiliaries in asymmetric synthesis, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 835-876.
- [21] Gage, J. R.; Evans, D. A., (S)-4-(phenylmethyl)-2-oxazolidinone [2-Oxazolidinone, 4-(phenylmethyl)-,(S)-] *Org. Synth.*, 68 (1990) 77-79.
- [22] Zappia, G.; Cancelliere, G.; Gacs-Baitz, E.; DelleMonache, G.; Misiti, D.; Nevola, L.; Botta, B., Oxazolidin-2-one ring, a popular framework in synthetic organic chemistry part 2 [1]. Applications and modifications, *Curr. Org. Synth.*, 4 (2007) 238-307.
- [23] Chankvetadze B., Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 309–363.
- [24] Chankvetadze B., Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques. The story of 20 and a few more years, *J. Chromatogr. A*, 1169 (2007) 45–70.

- [25] Scriba G.K.E., Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55 (2011) 688–701.
- [26] Lämmerhofer M., Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 814–856.
- [27] Chankvetadze B., Fanali S., Special issue, Enantioseparations, *J. Chromatogr. A*, 1363 (2014) 1–371, 5-9.
- [28] Easson L.H, Stedman E., Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity, *Biochem J.*, 27 (1933) 1257-1266.
- [29] Ogston A. G., Interpretation of experiments on metabolic using isotopic tracer elements, *Nature*, 163 (1948) 963.
- [30] Mesecar A. D.; Koshland Jr. D. E., A new model for protein stereospecificity, *Nature*, 403 (2000) 614–615.
- [31] Davankov V.A., The nature of chiral recognition: Is it a three-point interaction? *Chirality*, 9 (1997) 99-102.
- [32] Fanali S., Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 735 (1996) 77-121.
- [33] Bednarek E.; Bocian W.; Michalska K., NMR and molecular modeling study, as complementary techniques to capillary electrophoresis method to elucidate the separation mechanism of linezolid enantiomers, *J. Chromatogr. A*, 1193 (2008) 164–171.
- [34] Servais A.-C.; Rousseau A.; Fillet M.; Lomasadze K.; Salgado A.; Crommen J.; Chankvetadze B., Separation of propranolol enantiomers by CE using sulphated- β -CD derivatives in aqueous and non-aqueous electrolytes: comparative CE and NMR study, *Electrophoresis*, 31 (2010) 1467–1474.
- [35] Chankvetadze L.; Servais A.-C.; Fillet M.; Salgado A.; Crommen J.; Chankvetadze B., Comparative enantioseparation of talinolol in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis and study of related selector-selectand interactions by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chromatogr. A*, 1267 (2012) 206–216.
- [36] Fejős I.; Kazsoki A.; Sohajda T.; Márványos E.; Volk B.; Szenté L.; Béni Sz., Interactions of non-charged tadalafil stereoisomers with cyclodextrin: capillary

electrophoresis and nuclear magnetic resonance studies, *J. Chromatogr. A*, 1363 (2014) 348–355.

[37] Servais A.-C.; Rousseau A.; Dive G.; Frederich M.; Crommen J.; Fillet M., Combination of capillary electrophoresis, molecular modelling and nuclear magnetic resonance to study the interaction mechanisms between single-isomer anionic cyclodextrin derivatives and basic drug enantiomers in a methanolic background electrolyte, *J. Chromatogr. A*, 1232 (2012) 59–64.

[38] Gübitz G.; Schmid M.G., Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 25 (2004), 3981-3996.

[39] Schneider H.J., Binding mechanisms in supramolecular complexes, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 48 (2009) 3924-3977.

[40] Scriba G.K.E., Chiral recognition in separation science – an update, *J. Chromatogr. A*, 1467 (2016) 56-78.

[41] Biedermann F.; Nau W. M.; Schneider H.-J., The hydrophobic effect revisited- studies with supramolecular complexes imply high-energy water as noncovalent driving force, *Angew. Chem. Int.*, 53 (2014) 11158-11171.

[42] Mura P., Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complex in aqueous solution: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 101 (2014) 238–250.

[43] Mura P., Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complex in the solid state: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 113 (2015) 226–238.

[44] Renslo A. R.; Luehr G. W.; Gordeev M. F., Recent developments in the identification of novel oxazolidinone antibacterial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (2006) 4227-4240.

[45] Hutchinson D. K., Oxazolidinone antibacterial agents: a critical review, *Curr. Top. Med. Chem.*, 3 (2003) 1021-1042.

[46] Poce G.; Zappia G.; Porretta G. C.; Botta B.; Biava M., New oxazolidinone derivatives as antibacterial agents with improved activity, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 18 (2008) 97-121.

[47] Phillips O. A.; Sharaf L. H., Oxazolidinone antimicrobials: a patent review (2012-2015), *Expert Opin Ther Pat.*, 26 (2016) 591-605.

[48] Im W. B.; Choi S. H.; Park J.-Y.; Choi S. H.; Finn J.; Yoon S.-H., Discovery of torezolid as a novel 5-hydroxymethyl-oxazolidinone antibacterial agent, *Eur. J. Med. Chem.*, 46 (2011) 1027-1039.

- [49] David M. Z.; Dryden M.; Gottlieb T.; Tattevin P.; Gould I. M., Recently approved antibacterials for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other Gram-positive pathogens: the shock of the new, *Int J Antimicrob Agents.*, 50 (2017) 303-307.
- [50] Locke J. B.; Finn J.; Hilgers M.; Morales G.; Rahawi S.; Kedar G. C.; Picazo J. J.; Im W.; Shaw K. J.; Stein J. L., Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the *cfr* methyltransferase gene or ribosomal mutations, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54 (2010) 5337-5343.
- [51] Gregory W. A.; Brittelli D. R.; Wang C.-L.; Kezar H. S. III; Carlson R. K.; Park C.-H.; Corless P. F.; Miller S. J.; Rajagopalan P.; Wuonola M. A.; McRipley R. J.; Eberly V. S.; Slee A. M.; Forbes M. J., Antibacterials. Synthesis and structure-activity studies of 3-aryl-2-oxooxazolidines. 2. The "A" group, *Med. Chem.*, 33 (1990) 2569-2578.
- [52] Liu J.; He B.; Yu A.; Zhou W., Synthesis and antibacterial activity of substituted oxotriazolylphenyl oxazolidinones, *Chem. Biol. Drug Des.*, 70 (2007) 65-69.
- [53] Liu J.; He B.; Yu A.; Zhou W., Synthesis and *in vitro* evaluation of substituted phenyl-piperazinyl-phenyl oxazolidinones against Gram-positive bacteria, *Chem. Biol. Drug Des.*, 69 (2007) 265-268.
- [54] Rudra S.; Sangita F.; Gujrati A.; Pandya M.; Bhateja P.; Mathur T.; Singhal S.; Rattan A.; Salman M.; Das B., Synthesis and antibacterial activity of novel oxazolidinones with methylene oxygen- and methylene sulfur-linked substituents at C5-position, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17 (2007) 4778-4783.
- [55] Liapikou A.; Cillóniz C.; Torres A., Investigational drugs in phase I and phase II clinical trials for the treatment of community-acquired pneumonia, *Expert Opin Investig Drugs*, 3 (2017) 1-10.
- [56] McKee E. E.; Ferguson M.; Bentley A. T.; Marks T. A.; Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 (2006) 2042-2049.
- [57] Lämmerhofer M., Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media I. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1068 (2005) 3–30.
- [58] Mulliken R. S., Electronic population analysis on LCAO-MO molecular wave functions, *J. Chem. Phys.*, 23 (1955) 1833-1839.
- [59] Person R. G., Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry, *J. Org. Chem.*, 54 (1989) 1423-1430.

- [60] Murray J. S.; Sen K., Molecular Electrostatic Potentials. Concepts and Applications, Elsevier, Amsterdam, 1996
- [61] Westall A.; Malmström T.; Petersson P., An observation of unusual temperature effects for enantioselective CZE employing highly sulphated- β -cyclodextrin, *Electrophoresis*, 27 (2006) 859–864.
- [62] Rizzi A., Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3079–3106.
- [63] Mura P.; Furlanetto S.; Cirri M.; Maestrelli F.; Corti G.; Pinzauti S., Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous solutions and in the solid state, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37 (2005) 987–994.
- [64] Calabrò M. L.; Tommasini S.; Donato P.; Stancanelli R.; Raneri D.; Catania S.; Costa C.; Villari V.; Ficarra P.; Ficarra R., The rutin/-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2005) 1019–1027.
- [65] Barbachyn M. R., Patent Application Pub. No.: WO 94/13649; Pub. Date: Jun. 23, 1994; Tropone-substituted phenyloxazolidinone antibacterial agents.
- [66] Gravestock M. B.; Huynh H. K.; Hales N. J., Patent Application Pub. No.: US 2006/0058314 A1; Pub. Date: Mar. 16, 2006; Oxazolidinone derivatives and their use as antibacterial agents.
- [67] Okuom M. O.; Burks R.; Naylor C.; Holmes A. E., Applied circular dichroism: a facile spectroscopic tool for configurational assignment and determination of enantiopurity, *J. Anal. Methods Chem.* 2015: 865605, doi; 10.1155/2015/865605.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej były finansowane w ramach projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - grant promotorski nr. N405 034 32/2244.

Od 2004 roku w Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii będąc na stanowisku asystenta realizowałam badania w ramach działalności statutowej Instytutu. Wyniki zebrałam i opisałam w pracach **A.1. – A.5.** Od 2006 rozpoczęłam realizację grantu promotorskiego i zaproponowałam interdyscyplinarne podejście do badań nad rozdziałem achiralnym i chiralnym linezolidu; **A.6., A.7., A.8.**

Rozszerzenie możliwości zastosowania elektroforezy kapilarnej w analizie farmaceutycznej produktów leczniczych, realizowałam w następujących obszarach:

- dla modelu leku wieloantybiotykowego (**A.1.**), zawierającego: penicylinę G, dihydrostreptomycynę i prokainę, zaproponowałam metodę elektroforezy strefowej (CZE, ang. *capillary zone electrophoresis*) – prostą, szybką, łatwą do odtworzenia, niewymagającą drogich odczynników, co stanowiło nowe rozwiązanie w analizie farmaceutycznej badanych związków,
- dla oznaczania pojedynczego antybiotyku: fenoksymetylopenicyliny (**A.4.**), różnych soli penicyliny G (**A.2.**), tiamfenikolu i jego kongenerów (**A.5.**), linezolidu (**A.7.**) i ertapenemu (**A.9.**), zaproponowałam metodę micelarnej chromatografii elektrokinetycznej (MEKC, ang. *micellar electrokinetic chromatography*) charakteryzującą się wysoką czułością i selektywnością, która została wykorzystana w analizie farmaceutycznej wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych,
- dla oznaczania zanieczyszczeń achiralnych w preparatach zawierających wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwbakteryjne: fenoksymetylopenicylinę (**A.4.**), tiamfenikol (**A.5.**), cyprofloksacynę (**A.3.**), linezolid (**A.7.**) oraz ertapenem (**A.9.**) zaproponowałam różne techniki elektromigracyjne umożliwiające rozdział wszystkich znanych zanieczyszczeń zgodnie z wymaganiami farmakopealnymi lub ze zwalidowanymi metodami producenta,
- dla linezolidu,
 - o korzystając z techniki cEKC opracowałam zupełnie nową metodę analityczną, pozwalającą na rozróżnienie enancjomerów oraz oznaczanie czystości chiralnej (**A.6.**),
 - o wyjaśniono proces chiralnego różnicowania dla wybranego selektora chiralnego, korzystając z metody NMR i modelowania molekularnego (**A.8.**),
 - o korzystając z metody MEKC, w celu zwiększenia czułości metody zaproponowałam technikę zatężania próbki bezpośrednio w kapilarze – zmiatanie (ang. *sweeping*). Zoptymalizowana metoda pozwoliła na szybkie, proste i efektywne rozdzielenie linezolidu od jego znanych achiralnych 14-stu zanieczyszczeń (**A.7.**),

- dla ertapenemu (**A.9.**), w celu zwiększenia czułości metody korzystając z metody MEKC, zastosowałam kolejną z technik zatężania próbki bezpośrednio w kapilarze – spiętrzanie, zarówno NSM, (ang. *normal stacking mode*), jak i SRMM (ang. *stacking with reverse migrating micelles*). Zoptymalizowana metoda pozwoliła na rozdział ertapenemu od jego znanych zanieczyszczeń.

Równolegle do prac oryginalnych powstawały prace przeglądowe, w których charakteryzowałam antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwbakteryjne (**B.1. – B.7.**). Pierwsze dotyczyły chinolonów i ich fluorowanych pochodnych, a zakres tematyczny obejmował budowę chemiczną, właściwości farmakologiczne, mechanizm działania, oporność drobnoustrojów, terapie i działania niepożądane. Następne prace dotyczyły charakterystyki oksazolidynonów, jako nowej grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. Kolejne prace dotyczyły daptomycyny – pierwszego antybiotyku lipopeptydowego i jego możliwości terapeutycznych oraz ertapenemu – nowo zarejestrowanego karbapenemu. W siódmej z kolei pracy przeglądowej podjęłam tematykę stosowania nowych antybiotyków stosowanych w zakażeniach skóry i tkanki podskórnej, w tym, oksazolidynonów, lipopeptydów, karbapenemów, streptogramin, fluorowanych chinolonów, drugiej generacji glikopeptydów oraz glicylocyklin.

b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu w 2008 r. stopnia doktora nauk farmaceutycznych, prace naukowo-badawcze prowadziłam w dwóch obszarach tematycznych. Realizowane były one w ramach działalności statutowej Instytutu.

Obszar I

Rozszerzenie możliwości zastosowania elektroforezy kapilarnej w analizie farmaceutycznej produktów leczniczych zawierających karbapenemy: dorypenemu, biapenemu oraz pierwszego zarejestrowanego przedstawiciela tej grupy, imipenemu. Imipenem stosowany jest wraz z inhibitorem enzymu dehydropeptydazy I (DHP-I), cylastatyną, która chroni go przed hydrolizą i inaktywacją, prowadzącą do zmniejszenia stężenia antybiotyku oraz powstania metabolitu potencjalnie nefrotoksycznego.

Wyniki zebrałam i opisałam w pracach, **C.1.**, **C.2.**, **C.5.** Była to naturalna kontynuacja działań podjętych w trakcie realizacji grantu promotorskiego, którego jednym z elementów była optymalizacja metody CE umożliwiająca badanie jakościowe produktów leczniczych zawierających ertapenem. Prace oryginalne poparte zostały

pracami przeglądowymi z zakresu badań stabilności karbapenemów (**D.1.**) oraz technik analitycznych stosowanych do analizy farmaceutycznej tej grupy antybiotyków (**D.2.**).

W pracy **D.1.** zawarto przegląd najnowszych wyników z zakresu kinetyki degradacji karbapenemów, mechanizmów ich degradacji, włączając hydrolizę kwasowo-zasadową, efekty katalityczne buforów oraz parametry termodynamiczne opisujące degradację karbapenemów w roztworach wodnych, jaki i w stanie stałym. Opisano degradację karbapenemów w zależności od czynników stresowych (rozpuszczalniki, pH, stężenie leku, temperatura, czas) oraz porównano struktury chemiczne produktów rozpadu oraz szlaki ich powstawania.

W pracy **C.1** wykorzystałam i zoptymalizowałam technikę zatężania próbki bezpośrednio w kapilarze - spiętrzania przez wprowadzenie próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego FASS (ang. *field-amplified sample stacking*) do oznaczania zawartości dorypenemu i jego substancji pokrewnych. Na podstawie przeprowadzonych badań, jako optymalne warunki rozdziału wybrano bufor fosforanowy (100 mM) o pH 2,9 zawierający 10% (v/v) metanolu, jako elektrolit podstawowy. W trakcie rozdziału zastosowałam niepowlekaną kapilarę krzemionkową, napięcie o wartości 25 kV, normalną polaryzację elektrod oraz detekcję UV, przy długości fali $\lambda = 214$ nm. Metoda została zwalidowana w zakresie, liniowości, dokładności, precyzji, uzyskując granice wykrywalności na poziomie 3,0 $\mu\text{g/ml}$. Na etapie selektywności metody rozdzieliłam wszystkie dostępne karbapenemy: imipenem, meropenem, ertapenem i dorypenem. W trakcie przeprowadzonych badań stresowych uzyskałam 10 produktów degradacji: DP-1, DRS, MDP₁ – MDP₈, które udało się rozdzielić elektroforetycznie w oparciu o opracowaną metodę. Zoptymalizowana metoda została porównana do dwóch zwalidowanych metod producenta i wykorzystana w analizie produktu leczniczego zawierającego dorypenem – Doribax 500 mg, proszek do sporządzania roztworu do infuzji.

Elektroforeza kapilarna pomimo licznych korzyści posiada również kilka ograniczeń, jedną z nich jest niewystarczająca czułość, dlatego w pracach, których jednym z celów było oznaczenie zawartości produktów degradacji, konieczne stało się zastosowanie zatężania próbki bezpośrednio w kapilarze. W pracy **C.2.** wybrałam i zoptymalizowałam technikę zmiatania w MEKC (ang. *micellar electrokinetic chromatography with sweeping in an enhanced electric field*). Do rozdzielania biapenemu od jego substancji pokrewnych zastosowałam MEKC ze zmiataniem na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola, stosując detekcję

spektrofotometryczną, DAD przy $\lambda=200$ nm. Najlepsze wyniki otrzymałam dla buforu mrówczanowego (22,5 mM), pH 4,3 z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (150 mM). Zastosowałam neutralną kapilarę przy odwróconej polaryzacji elektrod i wartości napięcia, 22 kV. Zoptymalizowana metoda oznaczania biapenemu, została zwalidowana, biorąc pod uwagę następujące parametry: liniowość, dokładność, precyzję, uzyskując granice wykrywalności (LOD) na poziomie 0,5 $\mu\text{g/ml}$ przy $S/N = 3$ dla biapenemu. Powtarzalność systemu CE, wyrażona przez względne odchylenia standardowe (RSD) dla czasów migracji biapenemu i jego substancji pokrewnych wahała się od 0,1 do 1,5%, natomiast dla skorygowanych pól powierzchni RSD wyniosła $0,7 \div 8,4\%$. Zastosowanie metody MEKC ze zmiataniem na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola pozwoliło na proste i skuteczne rozdzielenie biapenemu od jego produktów degradacji, zapewniając równocześnie bezpieczeństwo w odniesieniu do środowiska naturalnego. Opracowana metoda MEKC przyniosła skuteczną poprawę czasu analizy w stosunku do odpowiedniej metody HPLC. Ponadto, otrzymany limit LOQ odpowiada sprawozdawczemu progowi 0,05% dla leku w dawce maksymalnej ≤ 2 g/dzień, zgodnie z wymaganiami dla wytycznych ICH Q3A „Zanieczyszczenia w nowych substancjach leczniczych”. Metoda może być stosowana jako alternatywny sposób oznaczania biapenemu w rutynowej analizie kontroli jakości leków, będąc odpowiedzią na bardzo aktualny problem ochrony środowiska naturalnego i rozwiązaniem w ramach koncepcji zakładającej projektowanie i przeprowadzanie procesów chemicznych w taki sposób, aby ograniczyć użycie i powstawanie szkodliwych substancji, tzw. zielonej chemii (ang. *green chemistry, sustainable chemistry*).

Do oznaczania imipenemu i cylastatyny (**C.5.**) zastosowałam MEKC, stosując detekcję spektrofotometryczną (DAD), w celu monitorowania powstałych produktów degradacji imipenemu i cylastatyny. Najlepsze wyniki otrzymałam dla buforu CEofixTM MEKC KIT 25-75, pH 9,2 z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu, 75 mM. Zastosowano niepowlekaną kapilarę przy normalnej polaryzacji elektrod i wartości napięcia, 25 kV. Zoptymalizowana metoda oznaczania imipenemu i cylastatyny, została zwalidowana biorąc pod uwagę następujące parametry: selektywność, liniowość, dokładność, precyzję, uzyskując granicę wykrywalności na poziomie 0,4 $\mu\text{g/ml}$ oraz 0,2 $\mu\text{g/ml}$ przy $S/N = 3$ odpowiednio dla imipenemu i cylastatyny.

W celu potwierdzenia selektywności metody, roztwory substancji czynnych poddano działaniu warunków stresowych. Uzyskane wyniki potwierdzają fakt

hamowania przez cylastatynę powstawania produktów degradacji powstających w wyniku chemicznej hydrolizy albo w wyniku przechowywania wodnych roztworów imipenemu. W celu monitorowania powstałych produktów degradacji imipenemu próbka wodnego roztworu imipenemu była badana z wykorzystaniem detektora DAD. Imipenem ma charakterystyczne chromofory przy, $\lambda=302$ nm, które w wyniku otwarcia pierścienia β -laktamowego przesuwają się w kierunku $\lambda=288$ nm, natomiast pochodne 2-piroliny mają specyficzne chromofory przy, $\lambda=266$ nm, które z czasem zmniejszają swoją intensywność. Uzyskane wyniki testów przeprowadzonych w warunkach stresowych potwierdzają selektywność zoptymalizowanej metody MEKC.

Powtarzalność systemu CE, wyrażona przez względne odchylenia standardowe dla czasów migracji imipenemu i cylastatyny wyniosła 0,6% i 0,8%, natomiast dla skorygowanych pól powierzchni, RSD wyniosła 1,1% oraz 1,0%, odpowiednio dla imipenemu i cylastatyny. Wyniki uzyskane dla oznaczania imipenemu i cylastatyny metodą MEKC porównano ze zwalidowaną metodą HPLC. Przeprowadzona ocena statystyczna uzyskanych wyników pozwala uznać opracowaną metodę MEKC jako metodę alternatywną w stosunku do metody HPLC.

Obszar II

Prace naukowo-badawcze w drugim obszarze obejmują swoim zakresem, fosamil ceftaroliny (**C.9.**) oraz ceftobiprol, oba związki to przedstawiciele V generacji cefalosporyn. Obecnie ceftobiprol jest na etapie opracowywania metody analitycznej mającej na celu identyfikację produktów degradacji i poznanie scenariuszy degradacji samego związku.

W pracy **C.9.** zoptymalizowano i zwalidowano metodę oznaczania fosamili ceftaroliny (CF) przy zastosowaniu metody HPLC z elucją gradientową oraz identyfikacji zanieczyszczeń metodą LC-MS/MS. Optymalne wyniki otrzymano stosując elucję gradientową z wykorzystaniem 0,05 M buforu amonowego pH = 3,5 jako fazę ruchomą A i acetonitryl jako fazę ruchomą B. Rozpuszczalnikiem zastosowanym do przygotowania próbek była mieszanina wodno-organiczna: 0,05 M bufor amonowy pH 3,5: acetonitryl (9:1 v/v).

Eksperymenty LC-MS/MS wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego Dionex Ultimate 3000 UPLC sprzężonego z detektorem masowym Bruker Daltonics maXis 4G. Reprezentatywną liczbę próbek CF analizowano przy zastosowaniu techniki spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania i analizatorem czasu przelotu

(LC-ESI-Q-TOF-MS) w celu zidentyfikowania substancji pokrewnych, które uzyskano w warunkach stresowych. Opracowana metoda wykazała dobrą selektywność i liniowość [$r > 0,998$ w zakresie 0,8 - 1,2 mg/mL (80 - 120%) oraz $r > 0,997$ w zakresie 0,005 - 0,015 mg/mL (0,5 - 1,5%)]. Wartości LOD i LOQ wyniosły odpowiednio 0,15 µg/mL i 0,5 µg/mL. Degradacja fosamilu ceftaroliny została przeprowadzona w warunkach zasadowych, kwasowych i utleniających, a także termolizy i fotolizy. W celu indukcji charakterystycznych produktów degradacji CF i późniejszej ich identyfikacji oraz poznania możliwych scenariuszy degradacji samego związku, analizowano wrażliwość roztworów CF przechowywanych w temperaturze pokojowej. Zgodnie z przewidywaniami zarówno termoliza, fotodegradacja, jak i przechowywanie w temperaturze pokojowej, przyspieszyły rozpad CF i powstawanie substancji pokrewnych. Natomiast nie zaobserwowano produktów degradacji w warunkach zasadowych i kwasowych. Opracowana metoda LC-MS/MS pozwoliła na identyfikację siedmiu produktów rozkładu: CFI-A, CFI-B, CFI-C, CFI-D, CFI-E, CFI-F, CFI-G. Dodatkowo, w celu potwierdzenia selektywności opracowanej metody przeprowadzono rozdział 9 antybiotyków z grupy cefalosporyn o zbliżonej budowie chemicznej: cefepimu, cefapiiryny, ceftazydymu, cefpiromu, cefalonium, cefotaksymu, ceftaroliny fosamilu, cefqinomu i cefalotyny.

Dodatkowo, poza tymi dwoma obszarami tematycznymi jestem autorem prac przeglądowych (**E.1.**, **E.2.**) poświęconych problematyce wykorzystania CE jako nowoczesnego narzędzia w analizie chiralnej leków, obejmujące swoim zakresem zarówno mechanizm elektroforetycznego rozdzielania związków chiralnych, przegląd selektorów chiralnych, jak również przegląd technik elektromigracyjnych stosowanych do rozdzielania związków chiralnych.

Natomiast w pracy **E.3.** zaktualizowałam i zanalizowałam przegląd piśmiennictwa z zakresu możliwości zastosowania nowych antybiotyków i chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w leczeniu bakteryjnych zakażeń krwi (bakteriemii). Opisałam możliwości daptomycyny, linezolidu, chinupristyny/dalfopristyny, tygecykliny, dalbawacyny, ceftobiprolu, w leczeniu zakażeń powodowanych przez bakterie Gram-dodatnie. Natomiast w przypadku zakażeń powodowanych przez bakterie Gram-ujemne, szczególnie wielolekooporne szczepy *Klebsiella pneumoniae* oraz *E. coli*, odporne na antybiotyki β-laktamowe, wytwarzające β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym i metalo-β-laktamazy, odnotowuje się ogromny problem skuteczności antybiotykoterapii. Opisałam możliwości zastosowania antybiotyków β-

laktamowych, dorypenemu, tygocykliny oraz zwróciłam uwagę na możliwości terapeutyczne kolistyny, która może przeciwdziałać rozwojowi wstrząsu endotoksycznego. Opisałam również możliwości neutralizacji biologicznie aktywnego lipopolisacharydu polegającą na prowadzeniu hemoperfuzji z użyciem filtrów kolumnowych z włóknami pokrytymi polimyksyną B.

c) najbliższa przyszłość

Część uzyskanych w badaniach eksperymentalnych wyników nie została jeszcze opisana, a jedynie zaprezentowana w postaci doniesień zjazdowych w trakcie konferencji międzynarodowych. Doniesienia te dotyczyły wyjaśnienia procesu kompleksowania tedyzolidu z HDAS- β CD z wykorzystaniem NMR i modelowania molekularnego (**I.7.** praca we współpracy z Zakładem Leków Sfałszowanych i Używek NIL), rozdzielania enancjomerów sutezolidu techniką NACE (**I.9.**) oraz identyfikacji sutezolidu i jego kluczowych produktów pośrednich metodami spektralnymi (**I.10.** zadanie było realizowane z dr hab. Judytą Cielecką-Piontek z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu).

Celem doniesienia zjazdowego **I.7.** było poszerzenie wiedzy na temat tworzenia kompleksu inkluzyjnego między TED a HDAS- β -CD (TED-HDAS- β -CD), w szczególności na temat stechiometrii, trybu i głębokości inkluzji do hydrofobowej wnęki CD, wykorzystując pomiary NMR i modelowania molekularnego. Powtórzenie badań zaproponowanych w pracy **H.2.** przyniosło mało znaczące i niejednoznaczne wyniki, dlatego zdecydowano o przeprowadzeniu pomiarów w D₂O.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- zwiększenie rozpuszczalności TED w wodzie po dodaniu HDAS- β -CD wskazuje na tworzenie kompleksów między TED a HDAS- β -CD;
- TED oddziałuje głównie z wewnętrznym hydrofobowym obszarem wnęki HDAS- β -CD;
- obserwowano efekty dla sygnałów protonów pirydynowych TED, co może świadczyć o tym, że inkluzja następująca przez część tetrazolu jest bardziej prawdopodobna niż poprzez część oksazolidynową;
- widmo wielowymiarowe 2D ROESY dla roztworu TED-HDAS- β -CD wykazuje szereg wzajemnych międzycząsteczkowych sprzężeń między protonami. Najbardziej znaczące wzajemne sprzężenia między protonami występują

między: protonami fenyłowymi i pirydynowymi TED a protonami H3 HDAS- β -CD oraz pomiędzy protonami pirydynowymi TED a H5 HDAS- β -CD;

- wyniki uzyskane metodą modelowania molekularnego są zgodne z wynikami doświadczalnymi uzyskanymi techniką NMR i potwierdzają sposób wiązania tедыzolidu przez HDAS- β -CD. Obliczone entalpie tworzenia kompleksów są bardziej uprzywilejowane dla inkluzji następującej poprzez część tetrazolową tедыzolidu do HDAS- β -CD.

Celem doniesienia zjazdowego **I.9.** było opracowanie zasad rozdzielania związku optycznie czynnego sutezolidu i jego enancjomeru (*R*)- przy użyciu CCDs stosując elektroforezę w warunkach niewodnych, NACE. Zastosowanie tej wymagającej techniki zostało wymuszone przez brak rozpuszczalności sutezolidu w roztworach wodnych. W celu określenia wpływu struktury badanych związków wobec zmieniających się warunków elektroforetycznych, zbadano możliwość rozdzielania chiralnych izomerów sutezolidu, jak i LIN, równocześnie w tych samych warunkach. Obserwowano również oddziaływania CCDs z zsyntetyzowanymi prekursorami izomerów LIN i TED w warunkach NACE.

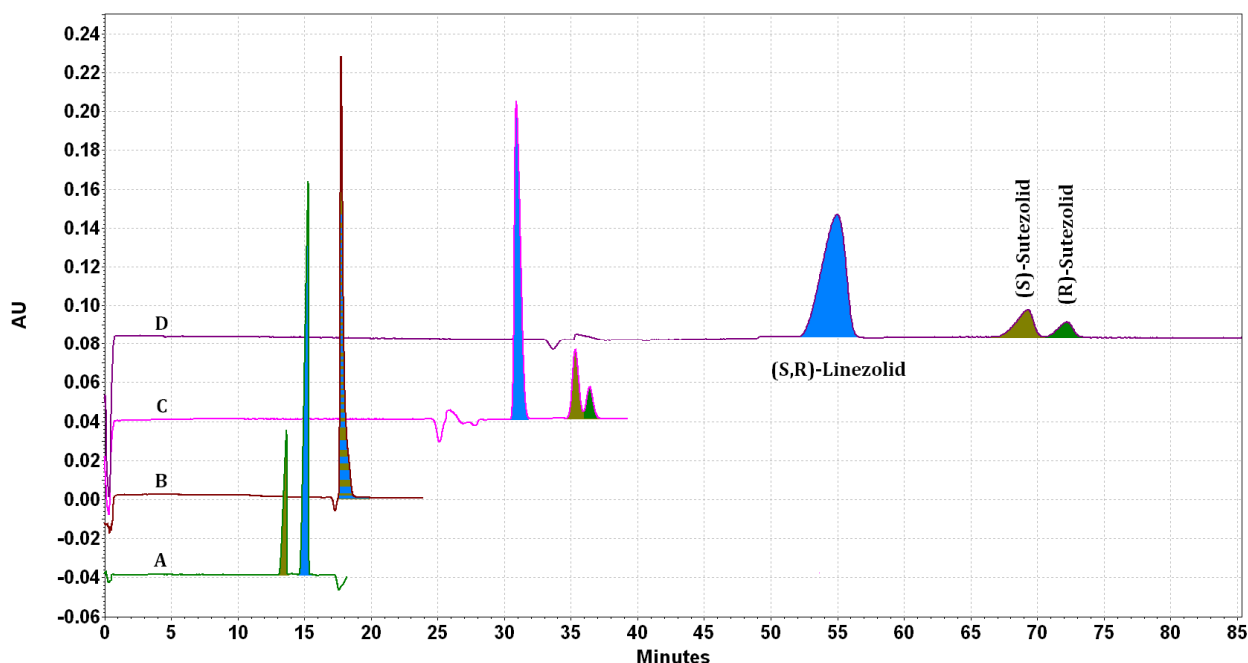
W tym celu:

- zsyntetyzowano (*R*)-sutezolid - niedostępne komercyjnie chiralne zanieczyszczenie (*S*)-sutezolidu;
- potwierdzono tożsamość (*R*)-sutezolidu metodą FT-IR, rozpraszania Ramana;
- potwierdzono konfigurację sutezolidu metodą ECD;
- zoptymalizowano kluczowe parametry dla rozdzielania izomerów sutezolidu i LIN techniką NACE; rodzaj i stężenie selektora chiralnego, skład BGE, rodzaj modyfikatorów organicznych oraz bezwodnych kwasów organicznych, temperaturę oraz przyłożone napięcie;
- wykonano pomiary ECD w warunkach bezwodnych dla kompleksów supramolekularnych sutezolidu z HDAS- β CD i HDMS- β CD.

Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

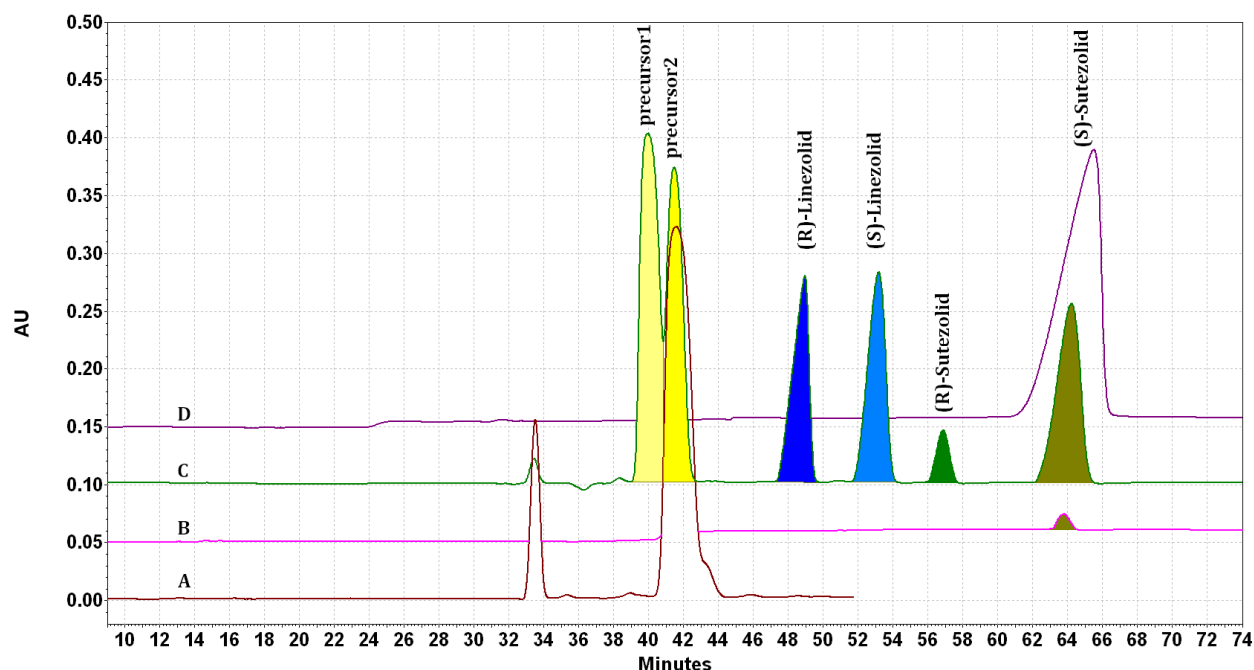
- niewodna elektroforeza kapilarna wykorzystująca cyklodekstrynę jako chiralną pseudofazę (CD-NACE) jest atrakcyjną techniką rozdzielania enancjomerów sutezolidu;

- najbardziej hydrofilowy selektor spośród testowanych HS- β -CD nie jest rozpuszczalny w buforze NACE;
- HDAS- β -CD i HDMS- β -CD pozwoliły na rozdzielanie enancjomerów sutezolidu, natomiast HDMS- β -CD - linezolidu; jednak (*R*)-sutezolid migrował za pikiem głównym w przypadku użycia HDAS- β -CD (**Rycina 4**), podczas gdy dla HDMS- β -CD obserwowano bardzo korzystne odwrócenie kolejności migracji enancjomerów (**Rycina 5**);
- co ciekawe, zsyntetyzowane prekursorzy (1 i 2) analogów sutezolidu i linezolidu oraz tедыzolidu, przy użyciu HDMS- β -CD, nie zostały rozdzielone (**Rycina 5**), co oznacza, że pierścienie tiomorfololiny (jak w sutezolidzie) i morfoliny (jak w linezolidzie) mają znaczący wpływ na enancjoselektywne oddziaływanie pomiędzy badanymi oksazolidynonami a selektorem chiralnym;
- widma ECD wykazują subtelne różnice w charakterystycznym paśmie przy 258 ± 2 nm. HDAS- β -CD indukował ujemny efekt Cottona zarówno dla sutezolidu, jak i linezolidu, podczas gdy HDMS- β -CD podnosi sygnał i przesuwają widmo nieznacznie w kierunku fal krótszych, co może świadczyć o podobnym mechanizmie kompleksowania. Wyniki przedstawiono na **rycinie 6**;

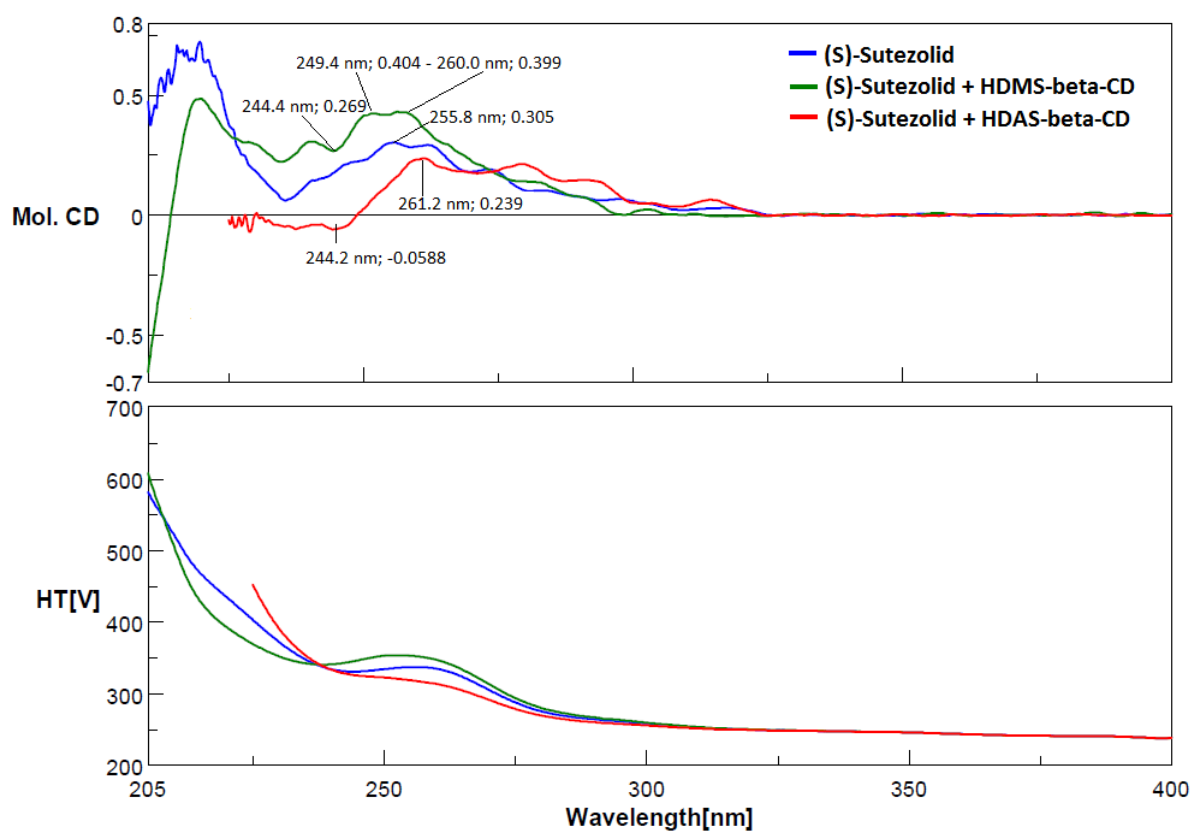


Rycina 4. Nałożone elektroforogramy rozdzielania mieszaniny linezolidu i jego zanieczyszczenia (*R*)-, a także sutezolidu i jego zanieczyszczenia (*R*)-.

Warunki doświadczalne: MeOH/ACN (85:15, v/v) zawierający 200 mM kwasu trifluorooctowego (TFA)/ 20 mM mrówczanu amonu, suplementowany HDAS- β -CD: (**A**) 0 mM, (**B**) 1 mM (**C**) 3 mM i (**D**) 5 mM. Pozostałe parametry: hydrodynamiczne wprowadzenie próbki pod ciśnieniem, 0,5 psi przez 5 s; niepowlekana kapilara, napięcie 25 kV, normalna polaryzacja elektrod; detekcja, UV 258 nm.



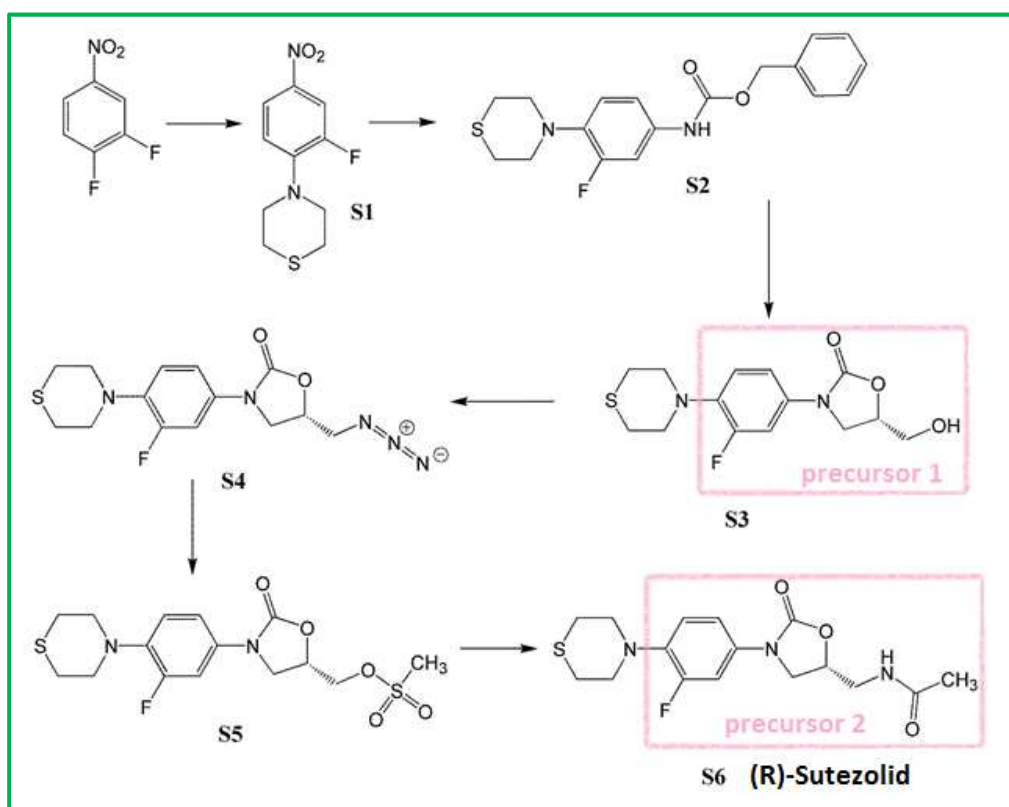
Rycina 5. Nałożone elektroforogramy rozdzielania mieszaniny LIN i jego zanieczyszczenia (R)-, sutezolidu i jego zanieczyszczenia (R)-, a także prekursorów z grupą hydroksymetylową lub metylacetamidową w pozycji C5, prekursor 1 i 2, odpowiednio; Warunki doświadczalne: NACE, BGE, jak na rycinie 4, suplementowany 45 mM HDMS- β -CD: (A) prekursor 2, (B) (S)-sutezolid w stężeniu 0,2 mg/ml, (C) (S)-sutezolid w stężeniu 4,4 mg/ml; (R)-sutezolid w stężeniu 0,8 mg/ml; (S)-LIN w stężeniu 3 mg/ml; (R)-LIN, 2,4 mg/ml (D) (S)-sutezolid, 15,0 mg/ml.



Rycina 6. Nałożone widma ECD z charakterystycznymi pasmami dla: (S)-sutezolidu w buforze NACE (niebieska linia), (S)-sutezolidu rozpuszczonego w NACE suplementowanym 5 mM HDAS- β -CD (niebieska linia), (S)-sutezolidu rozpuszczonego w NACE suplementowanym 5 mM HDMS- β -CD (niebieska linia).

(czerwona linia) i (S)-sutezolidu rozpuszczonego w NACE suplementowanym 45 mM HDMS- β -CD (zielona linia).

Celem doniesienia zjazdowego (**I.10.**) była spektroskopowa identyfikacja wybranych kluczowych produktów pośrednich syntezy sutezolidu z zastosowaniem chiralnego syntonu, jako wyjściowego bloku budulcowego. Schemat syntezy sutezolidu przedstawiono na **rycinie 7**, gdzie czcionką pogrubioną zaznaczono odpowiednie półprodukty syntezy, których identyfikacja została potwierdzona metodami spektralnymi, FT-IR i rozpraszaniem Ramana.



Rycina 7. Schemat syntezy sutezolidu.

S1 4-(2-fluoro-4-nitrofenylo)tiomorfolina),

S2 4-[2-fluoro-4-(benzyloksykarbonylo)aminofenylo]tiomorfolina,

S3 (R)-[3-[3-fluoro-4-(4-tiomorfolinylo)fenylo]-2-okso-5-oksazolidynylo]metanol,

S4 (R)-[[3-(3-fluoro-4-(4-tiomorfolinylo)fenylo]-2-okso-5-oksazolidynylo]metylo] azydek,

S5 (R)-[[3-[3-fluoro-4-(4-tiomorfolinylo)fenylo]-2-okso-5-oksazolidynylo]metylo]-p-toluenosulfonian,

S6 sutezolid - produkt końcowy syntezy.

W Tabeli 1 przedstawiono charakterystyczne pasma wibracyjne IR i Ramana dla sutezolidu.

Tabela 1. Charakterystyczne pasma wibracyjne IR/Raman doświadczalne i teoretyczne przypisane dla sutezolidu z użyciem bazy funkcyjnej 6-31G (d,p)++

$\nu_{\text{exp,IR}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{exp,R}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{t.}}$ (cm^{-1})	Przypisanie pasm
	547	550	Drgania deformujące pierścień 3-fluorofenylowy + C–H w w pierścieniu tiomorfolinowym
	576	580	Wahadłowe w pierścieniu 3-fluorofenylowym i pierścieniu oksazolidynowym
	610	608	Deformujące wszystkie pierścienie
	665	661	C–S s + def. pierścieniu 3-fluorofenylowym i pierścieniu oksazolidynowym
	725	725	Def. pierścień 3-fluorofenyłowy i pierścień tiomorfolinowy
747	749	756	N–C–O b oop + C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyl owym
805		810	C–H w w pierścieniu 3-fluorofenylowym
	850	852	Drgania „breathing” pierścienia oksazolidynowego + C–N s + C–C s w metylacetamidzie
914	914	912	Drgania „breathing” pierścienia tiomorfolinowego i pierścienia oksazolidynowego + def. pierścień 3-fluorofenyłowy
970	973	987	Def. pierścień tiomorfolinowy (C–C s + C–S s + C–N s)
	998	1010	CH ₂ t w pierścieniu tiomorfolinowym
1013		1027	C–O s w pierścieniu oksazolidynowym + C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym
1037	1036	1056	C–C s głównie w pierścieniu tiomorfolinowym + C–H r w pierścieniu tiomorfolinowym
1082	1084	1101	C–O s w pierścieniu oksazolidynowym + C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym + C–H w w pierścieniu 3-fluorofenyl owym
1105	1105	1128	C–O s w pierścieniu oksazolidynowym + C–N s w pierścieniu tiomorfolinowym + C–C s we wszystkich pierścieniach
1157		1173	C–H w + C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym
	1176	1197	C–H w głównie w pierścieniu tiomorfolinowym
	1205	1232	C–N s w pierścieniu oksazolidynowym + C–F s + C–H w
1225		1257	C–H r + C–C s w pierścieniu tiomorfolinowym
	1260	1290	C–H w + C–N s w pierścieniu tiomorfolinowym i pierścieniu oksazolidynowym
1288		1295	CH ₂ t w metylacetamidzie
	1297	1322	CH ₂ r
1322	1324	1356	C–N s w pierścieniu oksazolidynowym + C–F s + CH ₂ w
1418		1417	CH ₂ w w pierścieniu oksazolidynowym i pierścieniu tiomorfolinowym + C–N s w pierścieniu oksazolidynowym i metylacetamidzie
1427	1422	1431	C–N s głównie w pierścieniu oksazolidynowym + CH ₂ w w pierścieniu oksazolidynowym i pierścieniu tiomorfolinowym
1476	1477	1496	CH ₂ sc w pierścieniu tiomorfolinowym
1492		1530	CH ₂ sc w pierścieniu oksazolidynowym
1518		1542	C–N s w metylacetamidzie + C–H w + C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym
1564		1602	C–C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym
1641	1629	1665	C=C s w pierścieniu 3-fluorofenyłowym
	1662	1763	C=O s w metylacetamidzie
1749	1750	1846	C=O s w pierścieniu oksazolidynowym
2760	2757	2955	C–H s w pierścieniu tiomorfolinowym
	2838	3025	C–H s w metylacetamidzie
	2905	3045	C–H s w grupie CH ₃
3477		3638	N–H s

Wszystkie pozycje w cm⁻¹; s - rozciągające (*stretching*), b - zginające (*bending*), r - wahadłowe (*rocking*), w - wachlarzowe (*wagging*), sc - nożycowe (*scissoring*), oop - zginające poza płaszczyznę (*out of the plane of the paper*), in - zginające w płaszczyznę (*in plane*), t - skręcające (*twisting*), asm – asymetryczne (*asymetric*), sym – symetryczne (*symetric*).

Publikacje oryginalne opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora znajdujące się w bazie Journal Citation Report (JCR)

A.1. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Capillary electrophoresis method for simultaneous determination of penicillin G, procaine and dihydrostreptomycin in veterinary drugs, *Journal of Chromatography B*, 800 (2004) 203-209.

Impact factor - 2,176; MNiSW – 11 punktów

A.2. Pajchel* G.; **Michalska K.**; Tyski S., Application of capillary electrophoresis to the determination of various benzylpenicillin salts, *Journal of Chromatography A*, 1032, (2004) 265-272.

Impact factor – 3,359; MNiSW – 13 punktów

A.3. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1051 (1-2), (2004) 267-272.

Impact factor – 3,359; MNiSW – 13 punktów

A.4. Pajchel* G.; **Michalska K.**; Tyski S., Analysis of phenoxymethylpenicillin potassium by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1087, (2005) 197-202

Impact factor – 3,096; MNiSW – 24 punktów

A.5. Pajchel* G.; **Michalska K.**; German R.; Tyski S., Assay of related compounds thiamphenicol, florphenicol and chloramphenicol by CE, *Chromatographia*, 68 (2008) 587-591

Impact factor – 1,312; MNiSW – 20 punktów

A.6. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Determination of enantiomeric impurity of linezolid by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin, *Journal of Chromatography A*, 1180 (2008) 179-186.

Impact factor – 3,756; MNiSW – 32 punktów

A.7. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Determination of linezolid and its achiral impurities using sweeping preconcentration by micellar capillary electrophoresis, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (2008) 321-330.

Impact factor – 2,629; MNiSW – 27 punktów

A.8. Bednarek* E.; Bocian W.; **Michalska K.**, NMR and molecular modeling study, as complementary techniques to capillary electrophoresis method to elucidate the separation mechanism of linezolid enantiomers, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 164-171.

Impact factor – 3,756; MNiSW – 32 punktów

A.9. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Different sample stacking strategies for determination of ertapenem and its impurities by micellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2934-2942.

Impact factor – 4,101; MNiSW – 32 punktów

Autorstwo lub współautorstwo prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Report (JCR), przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

B.1. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Charakterystyka chinolonów. Część I. Budowa chemiczna. Właściwości farmakologiczne, *Mikrobiologia Medycyna*, 4(33) (2002) 14-19.

MNiSW – 1 punkt

B.2. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Charakterystyka chinolonów. Część II. Mechanizm działania. Oporność drobnoustrojów. Terapia. Działania niepożądane, *Mikrobiologia Medycyna*, 4(33) (2002) 20-25.

MNiSW – 1 punkt

B.3. Michalska* K.; Tyski S., Charakterystyka oksazolidynonów, *Mikrobiologia Medycyna*, 1(38) (2004) 19-23.

MNiSW – 1 punkt

B.4. Michalska* K.; Tyski S., Daptomycyna - pierwszy antybiotyk lipopeptydowy - możliwości terapeutyczne, *Mikrobiologia Medycyna*, 4 (2004) 27-33.

MNiSW – 1 punkt

B.5. Michalska* K.; Tyski S., Ertapenem – nowy zarejestrowany karbapenem, *Farmacja Polska*, Tom 62, nr 2 (2006) 51 – 61.

B.6. Michalska* K.; Tyski S., Oksazolidynony – nowa grupa chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. *Zakażenia*, Tom 6, nr 1 (2006) 24-28.

MNiSW – 3 punkty

B.7. Michalska* K.; Tyski S., Nowe antybiotyki stosowane w zakażeniach skóry i tkanki podskórnej (SSTIs), *Zakażenia*, Tom 7, nr 2 (2007) 26-35.

MNiSW – 6 punkty

Autorstwo lub współautorstwo oryginalnych publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR), po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

C.1. Michalska* K.; Pajchel G.; Tyski S., Determination of doripenem and related substances in medicinal product using capillary electrophoresis; *J. Sep. Sci.* 34, (2011) 475-482.

IF – 2,733; MNiSW – 30 punktów

C.2. Michalska* K.; Cielecka-Piontek J.; Pajchel G.; Tyski S., Determination of biapenem in a medicinal product by micellar electrokinetic chromatography with sweeping in an enhanced electric field, *J. Chromatography A*, 1282 (2013) 153-160.
IF – 4,258; MNiSW – 40 punktów

C.3. Michalska* K.; Gruba E.; Cielecka-Piontek J.; Bednarek E., Chiral separation of tedizolid using charge single isomer derivatives of cyclodextrins by capillary electrokinetic chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120 (2016) 402-412.
IF – 3,255; MNiSW – 35 punktów

C.4. Michalska* K.; Mizera M.; Lewandowska K.; Cielecka-Piontek J., Infrared, Raman, and ultraviolet with circular dichroism analyses and theoretical calculations of tedizolid, *Journal of Molecular Structure*, 1115 (2016) 136-143.
IF – 1,753; MNiSW – 20 punktów

C.5. Karpiuk* I.; **Michalska K.;** Bukowska B.; Gruba E.; Tyski S., Determination of Imipenem and Cilastatin in Medicinal Products by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Current Analytical Chemistry*, 13(2) (2017) 158-166.
IF – 1,306; MNiSW – 20 punktów

C.6. Michalska* K.; Gruba E.; Bocian W.; Cielecka-Piontek J., Enantioselective recognition of radezolid by cyclodextrin modified capillary electrokinetic chromatography and electronic circular dichroism, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 139 (2017) 98-108.
IF – 3,255; MNiSW – 35 punktów

C.7. Michalska* K.; Gruba E.; Mizera M.; Lewandowska K.; Bednarek E.; Bocian W.; Cielecka-Piontek J., Application of spectroscopic methods (FT-IR, Raman, UV-CD and NMR) in studies of identification and optical purity of radezolid, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 183 (2017) 116-122.
IF – 2,653; MNiSW – 30 punktów

C.8. Michalska* K.; Bednarek* E.; Gruba E.; Lewandowska K.; Mizera M.; Cielecka-Piontek J., Comprehensive Spectral Identification of Key Intermediates to the Final Product of the Chiral Pool Synthesis of Radezolid, *Chemistry Central Journal*, 11:82 (2017) 1-16.
IF – 2,442; MNiSW – 30 punktów

C.9. Karpiuk* I.; **Michalska K.;** Bus K.; Kiljan M.; Tyski S., Identification and determination of related substances of ceftaroline fosamil in medicinal product by high performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145 (2017) 651-660
IF – 3,255; MNiSW – 35 punktów

Autorstwo lub współautorstwo prac przeglądowych opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR), po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

D.1. Cielecka-Piontek* J.; **Michalska K.**; Zalewski P.; Jelińska A., Recent advances in stability studies of carbapenems, *Current Pharmaceutical Analysis*, 7 (2011) 213-227.
IF – 1,155; MNiSW – 20 punktów

D.2. Cielecka-Piontek* J.; **Michalska K.**; Zalewski P.; Zasada S., Comparative review of analytical techniques for determination of carbapenems, *Current Analytical Chemistry*, 8 (2012) 91-115.
IF – 1,558; MNiSW – 25 punktów

D.3. Michalska* K.; Karpiuk I.; Król M.; Tyski S., Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21 (2013) 577-591.
IF – 2,951; MNiSW – 30 punktów

Autorstwo lub współautorstwo prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Report (JCR), po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

E.1. Michalska* K., Elektroforeza kapilarna jako nowoczesne narzędzie w analizie chiralnej leków. Część I. Mechanizm elektroforetycznego rozdzielania związków chiralnych, selektory chiralne, *Farm Pol*, 65(9) (2009) 673-678.
MNiSW – 6 punkty

E.2. Michalska* K., Elektroforeza kapilarna jako nowoczesne narzędzie w analizie chiralnej leków. Część II. Techniki elektromigracyjne stosowane do rozdzielania związków chiralnych, antybiotyki jako selektory i związki chiralne, *Farm Pol*, 65(12) (2009) 901-906.
MNiSW – 6 punkty

E.3. Michalska* K.; Tyski S., Możliwość zastosowania nowych antybiotyków i chemioterapeutyków w leczeniu bakteryjnych zakażeń krwi, *Farm Pol*, 67(5) (2011) 341-350.
MNiSW – 3 punkty

Udział w konferencjach o zasięgu międzynarodowym przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

F.1. European histamine research society 29th meeting, 17-21.05.2000 r., Nemi (Rome), Włochy,
D. Maślińska, E. Wojtecka, **K. Michalska**, M. Gajewski, J. Kowalczewski, S. Maśliński: Concentration and distribution of histamine in the cartilage of patients with rheumatoid arthritis (RA).

F.2. 3rd International Symposium on Separations in BioSciences SBS 2003, 13-18.05.2003, Moskwa, Rosja,
K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Capillary electrophoresis method for simultaneous determination of penicillin G, procaine and dihydrostreptomycin in veterinary drugs.

F.3. 27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 15-19.06.2003, Nicea, Francja

G. Pajchel*, **K. Michalska**, S. Tyski: Application of capillary electrophoresis to the determination of various benzylpenicillin salts.

F.4. 17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis, 8-12.02.2004, Salzburg, Austria,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis.

F.5. 25th International Symposium on Chromatography, 4-8.10.2004, Paryż, Francja

G. Pajchel*, **K. Michalska**, S. Tyski: Analysis of phenoxymethylpenicillin potassium by capillary electrophoresis.

F.6. Advances in chromatography and electrophoresis 2007 & Chiranal 2007, 24-27.06.2007, Olomouc, Czechy,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Determination of enantiomeric impurity of linezolid by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin.

F.7. 12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, ISLAND OF Elba, Italy, 23-26.09.2007,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Determination of linezolid and its achiral impurities using sweeping preconcentration by micellar capillary electrophoresis.

F.8. 32nd International Symposium on capillary chromatography and 5th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, 26-30.05.2008,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Different sample stacking strategies for determination of ertapenem and its impurities by micellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation.

F.9. Ehrlich II. 2nd World conference on magic bullets, Nürnberg, Germany, 03-05.10.2008 – wykład i przewodnicząca sesji:

K. Michalska* Analysis of linezolid chiral and achiral impurities by capillary electrophoresis.

Udział w konferencjach krajowych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

G.1. Sympozjum LEK, Problemy analityczne w ocenie czystości i farmakokinetyki leku, Kraków, 26-27 września 2002 r.,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Badanie czystości fluorochinolonów zarejestrowanych w Polsce.

G.2. Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice, Spodek, 25-28 września 2007 r.,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Elektroforeza kapilarna jako nowoczesne narzędzie w analizie chiralnej.

Udział w konferencjach o zasięgu międzynarodowym po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

I.1. 29th International Symposium on Chromatography (29th ISC), 9-13.09.2012, Toruń, Poland;

K. Michalska*, J. Cielecka-Piontek, G. Pajchel, S. Tyski: Determination of biapenem and related substances in medicinal product by MEKC with sweeping in an enhanced electric field.

I.2. Recent Developments in pharmaceutical analysis, RDPA2015, 28.06 – 01.07.2015, Perugia,

K. Michalska*, E. Gruba, J. Cielecka-Piontek, E. Bednarek: Chiral separation of tedizolid using charge single isomer derivatives of cyclodextrins by capillary electrokinetic chromatography.

I.3. ICAVS8 International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Wiedeń, Austria, 12-17 07. 2015,

J. Cielecka-Piontek*, **K. Michalska**, K. Lewandowska, M. Mizera, Application of FT-IR and Raman spectroscopy for study of impurities of tedizolid enantiomers

I.4. 18th International symposium on advances in extraction technologies & 22nd international symposium on separation sciences, EXTech2016&ISSS2015, 03-06.07.2016, Toruń, Polska,

I. Karpiuk*, **K. Michalska**, K. Bus, M. Kiljan, S. Tyski, Determination of related substances of ceftaroline fosamil in medicinal product by liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry.

I.5. XV Italian-Hungarian Symposium on Spectrochemistry pharmacological research and analytical approaches, Pisa, 12-16 June, 2016,

K. Michalska, E. Gruba, M. Mizera, K. Lewandowska, E. Bednarek, W. Bocian, J. Cielecka-Piontek*, Application of spectroscopic methods (FT-IR, Raman and NMR) for the identification of radezolid. Experimental and DFT based approach.

I.6. 31st international Symposium on Chromatography, ISC2016-POSTER-423, University Collage Cork, Irlandia, 28-01.09.2016,

K. Michalska*, E. Gruba, J. Cielecka-Piontek, Chiral separation of radezolid using charge single isomer derivatives of cyclodextrins by capillary electrokinetic.

I.7. XXVIIth International conference on magnetic resonance in biological systems. Frontier of magnetic resonance in biological systems, 21-26.08.2016, Kyoto, Japonia, E. Bednarek*, W. Bocian, L. Kozerski, J. Sitkowski, **K. Michalska**, E. Gruba, NMR and molecular modeling studies of Tedizolid-Cyclodextrin Inclusion complex in aqueous solution.

I.8. 52nd International Conference on Medicinal Chemistry, RICT2016, Caen, 6-8 July, Francja, 2016 52nd International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2016) in Caen,

K. Michalska, E. Gruba, M. Mizera, K. Lewandowska, J. Cielecka-Piontek*, Synthesis and spectroscopic intermediates and final products of innovative stereoselective synthesis of radezolid

I.9. 28th PBA2017, Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference, 2-5.07.2017, Madryt, Hiszpania,

K. Michalska*, E. Gruba, B. Pałys, J. Cielecka-Piontek, Nonaqueous capillary electrophoretic separation of sutezolid enantiomers using charge single isomer derivatives of cyclodextrins

I.10. EFMC-ASMC'17 International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Wiedeń, Austria – 27-31.08.2017, **K. Michalska**, E. Gruba, K. Lewandowska, B. Pałys, M. Mizera*, J. Cielecka-Piontek, Spectroscopic identification of intermediates and final products supported by theoretical approach of the chiral pool synthesis of sutezolid

Udział w konferencjach krajowych po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

J.1. Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, 15-16.10.2009,

K. Michalska*, G. Pajchel, S. Tyski: Oznaczanie doripenemu i jego substancji pokrewnych metodą elektroforezy kapilarnej.

Staże naukowe

-

Odbyte kursy i szkolenia naukowe

Brałam udział w kursach i szkoleniach, których zestawienie przedstawiłam w formie tabelarycznej:

Lp.	Temat / Tytuł	Organizator	Data / termin	Rodzaj i numer dokumentu kończącego
1.	Kontrola jakości w laboratorium rutynowym: - <i>reprezentatywne pobieranie próbek</i> , - <i>błędy w pomiarach i ich eliminowanie</i> , - <i>statystyka jako narzędzie walidacji metod analitycznych</i> , - <i>minimalizacja błędów w procesie analitycznym</i> , - <i>pomiar w warunkach kontrolowanych</i> , - <i>procedury postępowania w przypadku wyniku nieoczekiwanego</i> , - <i>działania zapobiegawcze</i>	Research Centre Juelich	10.09.2001 22.01.2002 19.02.2002	certyfikat
2.	System Jakości wg Normy PN-EN ISO 17025 dla Laboratoriów Badawczych i Wzorcujących	Pełnomocnik Dyrektora ds. Zapewnienia Jakości	10.05.2002 r.	zaświadczenie
3.	Kurs języka angielskiego na poziomie <i>Intermediate</i>	Szkoła językowa Lingwista	01.10.2001 – 05.06.2002	certyfikat Nr 002446

Lp.	Temat / Tytuł	Organizator	Data / termin	Rodzaj i numer dokumentu kończącego
4.	Kurs języka angielskiego na poziomie <i>Upper Intermediate</i>	King's School of English Bournemouth, Anglia	31.08 – 14.09.2002	certyfikat Akredytowane przez British Council
5.	Chromatografia cieczowa metody i zastosowanie	Zakład Usługowo-Szkoleniowy AVI-LAB pod egidą Komisji Analizy Chromatograficznej Komitetu Chemii Analitycznej PAN	24 – 27.03.2003 r.	zaświadczenie
6.	Capillary electrophoresis: Method Development and Validation in Context to Industrial application	Kevin Altria, Wassim Nashabeh Salzburg, Austria	08.02.2004 r.	zaświadczenie
7.	Spektrofotometria Absorpcyjna w Zakresie Widzialnym (VIS) i Nadfiolecie (UV)	Zakład Usługowo-Szkoleniowy AVI-LAB w Warszawie	16 – 19 02.2004 r.	zaświadczenie
8.	Kurs języka angielskiego na poziomie zaawansowanym	Centrum Kształcenia „Troll”	20.10.2003 – 30.06.2004 r.	zaświadczenie
9.	Przeniesienie metod analitycznych i nowe trendy w walidacji metod analitycznych	Research Centre Juelich	17.10.2006	certyfikat
10.	Szkoła HPLC i technik łączonych	Politechnika Warszawska Szkoła Zaawansowanych Technologii Chemicznych i Materiałowych Wydział Chemiczny	15.11 – 18.11.2007	zaświadczenie
11.	Merck – Nowe możliwości chromatografii cieczowej HPLC w przemyśle farmaceutycznym	Merck	10.02.2009	certyfikat
12.	Szybka chromatografia cieczowa w każdym laboratorium	Shim-pol	12.10.2009	certyfikat
13.	Weryfikacja hipotez statystycznych. Hipotezy parametryczne	KTI	08.10.2012	-----
14.	Writing great papers in international journals an introduction for researchers	Wiley	15.01.2013	certyfikat
15.	Technika TLC	KTI	28.05.2013	-----
16.	Nowe osiągnięcia w analityce farmaceutycznej	Sigma-Aldrich	21.03.2013	certyfikat

Lp.	Temat / Tytuł	Organizator	Data / termin	Rodzaj i numer dokumentu kończącego
17.	Struktura, spektroskopia, stereochemia i synteza związków biologicznie aktywnych	Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii	26-27.06.14	certyfikat
18.	Nowe trendy w technice LC-MS/MS	AB Sciex i MS Ekspert	28.10.2014	certyfikat
19.	Statutowe zadania Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, związanych z dopuszczeniem do obrotu produktów leczniczych, nadzorem nad bezpieczeństwem farmakoterapii oraz badań klinicznych i inspekcji	URPLW MiPB	10.06.2016	certyfikat
20.	Szkolenia Systemu Zarządzania Jakością, zgodnie z normą ISO-17025	NIL	2010-2017	-----

Recenzje prac naukowych

Byłam recenzentem **21** prac naukowych w następujących czasopismach:

1. *Journal of Separation Science*, Simultaneous Chiral Separation of Tramadol and Methadone in Tablets, Human Urine, and Plasma by Capillary Electrophoresis using Maltodextrin as the Chiral Selector; jssc.201800003
2. *Analytical Methods*, Aqueous, non-aqueous electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography of a mixture of quinoline-2-thione and 8-mercaptoquinoline hydrochloride; Manuscript ID AY-COM-12-2017-002875
3. *Talanta*, Chiral capillary columns based on permethyl- β -cyclodextrin in matrices of different polarities. Enantioseparation of polar pesticides; Manuscript Number: TAL-D-17-02520
4. *Letters in Organic Chemistry*, A novel method for preparation of Linezolid, (S)-N-((3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl) methyl) acetamide; LOC-2016-1700
5. *Current Organic Chemistry*, Cyclodextrin as complexing agents: a review; BSP-COC-2016-853
6. *Medicinal Chemistry Communications*, Synthesis and antibacterial activities evaluation of C-5 side chain modified analogues of FYL-66 as potential antibacterial agents; MD-CAR-03-2015-000101
7. *Journal Separation Sciences*, Quantification of γ -aminobutyric acid in the heads of houseflies and Diamondback moths, using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection
8. *Chemia Analityczna*, Chemical Analysis, Capillary electrophoresis-electrochemiluminescence simultaneous detection of azithromycin, roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate; No. 34/09

9. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Development of 4-amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-prazol-3(2H)-one derivatives as a novel inhibitors of Mycobacterium tuberculosis enoyl acyl carrier protein reductase (InhA); BMCL-D-14-01103
10. *Current Medicinal Chemistry*, Oxazolidinones as antitubercular agents: discovery, development and future perspectives; CMC-2015-0120
11. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, Synthesis, characterization and biological activity of some new S-substituted derivatives of 5-(2-chlorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol; JCSP-131014-10432
12. *Advances in Chemistry*, Spectrophotometric determination of meropenem in bulk and injection formulations by *p*-chloranilic acid; No: 216972

Journal of Chromatography A

1. Dynamic pH junction-sweeping technique for on-line concentration of acidic amino acid in human serum by capillary electrophoresis with indirect UV detection; JCA-14-124
2. Capillary zone electrophoresis for the simultaneous determination of sulfadoxine and pyrimethamine in tablet formulations; JCA-11-756
3. A simple approach to enhance detection in capillary electrophoresis; JCA-09-1145
4. Quantitative analysis of lipopeptide antibiotic iturin A by high performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography; JCA-07-1752

Journal of Chromatography B

1. Determination of linezolid in low plasma volumes by HPLC with ultraviolet detection; JCB-09-184

Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis

1. A validated stability indicating LC-UV method for the determination of impurities and characterization new impurities by LC-MS/MS in linezolid active pharmaceutical ingredient; JPBA-D-11-01249R
2. A validated stability indicating LC-UV method for the determination of impurities and characterization new impurities by LC-MS/MS in linezolid active pharmaceutical ingredient; JPBA-D-11-01249R1
3. Synthesis and characterization of copper-doped ZnSe quantum dots as fluorescent probes for sparfloxacin; JPBA-D-14-00240
4. Enantiomeric Impurity Analysis using Circular Dichroism Spectroscopy with United States Pharmacopeia Liquid Chromatographic Methods; JPBA 2018 146

Udział w grantach naukowych

1. Grant promotorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt. „Optymalizacja metod elektroforezy kapilarnej stosowanych w badaniu produktów leczniczych zawierających wybrane antybiotyki”, nr N405 034 32/2244; **Główny wykonawca**
2. Projekt badawczy realizowany przez osobę rozpoczynającą karierę naukową posiadającą stopień naukowy doktora (Sonata 6); UMO.2013/11/D/NZ7/01230; **Kierownik projektu i główny wykonawca**

Współpraca naukowa

Współpraca z jednostkami spoza Narodowego Instytutu Leków

- Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; dr hab. Judyta Cielecka-Piontek, mgr. inż. Mikołaj Mizera – obliczenia teoretyczne, spektroskopia oscylacyjna FT-IR, spektroskopia Ramana;
- Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; dr hab. Przemysław Zalewski, na etapie tworzenia pracy przeglądowej dotyczącej karbapenemów;
- Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, dr Marek Król – wspólny projekt badawczy w ramach założonego konsorcjum NIL-WUM złożony w ramach konkursu Maestro 3 (marzec 2012) mający na celu doprowadzić do syntezy nowych pochodnych oksazolidynonów o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej, *„Synteza nowych związków z grupy oksazolidynonów, charakterystyka fizyko-chemiczna, analiza aktywności przeciwbakteryjnej a struktura związków”*; *„Synthesis of the new compounds from oxazolidinone group, physicochemical characteristic, analysis of antibacterial activity in relationship to compounds' structure”*;
- Pracownia Spektroskopii Optycznej Instytutu Chemii Organicznej PAN, grupa Pani Prof. dr hab. Jadwigi Frelek: dr Marcin Górecki, dr Aleksandra Butkiewicz, dr Magdalena Jawiczuk w zakresie pomiarów elektronowego dichroizmu kołowego badanych oksazolidynonów i ich prekursorów;
- Zakład Kryształów Molekularnych, Instytutu Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk, dr inż. Kornelia Lewandowska wykonanie pomiarów FT-IR, spektroskopii Ramana dla zsyntetyzowanych enancjomerów tedyzolidu, radezolidu i sutezolidu;
- Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii Uniwersytetu Warszawskiego, dr hab. Barbara Pałys, wykonanie pomiarów FT-IR i spektroskopii Ramana dla kompleksów oksazolidynonów z wybranymi selektorami chiralnymi.

Współpraca z jednostkami Narodowego Instytutu Leków

- Zakład Leków Sfałszowanych i Używek NIL, pracownia NMR; dr Elżbieta Bednarek, wykonanie pomiarów NMR i ich interpretacja, dr Wojciech Bocian, modelowanie molekularne.
- Zakład Leków Sfałszowanych i Używek NIL, pracownia XRPD, dr hab. Jan Maurin, badanie XRPD.
- Zakład Metod Spektrometrycznych NIL, dr hab. Arkadiusz Szterk, mgr. Katarzyna Bus, mgr. Monika Kiljan.

Otrzymane nagrody za działalność naukową:

1. Dyplom z wyróżnieniem, *summa cum laude*, dla rozprawy doktorskiej pt. "Optymalizacja metod elektroforezy kapilarnej stosowanej w badaniach produktów leczniczych zawierających wybrane antybiotyki", Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 29 października **2008** r.
2. Drugie miejsce w konkursie na nowe odkrycia naukowe i innowacje, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, przyznane przez Fundację - Hasco-Lek, **2009**.
3. Nagrodę zespołową naukową pierwszego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących optymalizacji metod elektroforezy kapilarnej w badaniach analitycznych produktów leczniczych zawierających wybrane antybiotyki, przyznana przez JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, **2010**.
4. Nagroda za najlepszy plakat " Determination of biapenem and related substances in medicinal product by MEKC with sweeping in an enhanced electric field", prezentowany podczas 29 Międzynarodowego Sympozjum na temat Chromatografii (29th ISC), 9-13 września 2012 r. Toruń, Polska; Best Poster Award, Springer, **2012**.
5. Nagrodę zespołową naukową drugiego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących badań związków przeciwbakteryjnych, przyznana przez JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, **2014**.

Działalność dydaktyczna

- a) pełnienie funkcji promotora pomocniczego w ukończonych przewodach doktorskich
-
- b) pełnienie funkcji promotora pomocniczego w rozpoczętych pracach doktorskich
-
- c) opieka na pracami magisterskimi
-
- d) prowadzone zajęcia dydaktyczne,
kierownictwo praktyk wakacyjnych dla studentów kierunków farmacji, chemii, biotechnologii w ramach współpracy z wydziałami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Politechniki Warszawskiej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

(UMP) oraz prowadzenie ćwiczeń z techniki elektroforezy kapilarnej dla studentów farmacji, chemii oraz biotechnologii.

e) osiągnięcia związane z popularyzacją nauki

-

Działalność organizacyjna

- Pełnienie funkcji Kierownika Pracowni Fizykochemicznych Właściwości Antybiotyków (6 osobowej), w ramach Zakładu Antybiotyków i Mikrobiologii NIL; od 1 lutego 2013 r. do chwili obecnej (od 02.01.2018 r. Kierownik Laboratorium Fizykochemicznych Właściwości Antybiotyków). Odpowiedzialność merytoryczna w zakresie działalności kontrolno-badawczej koordynowanej przez Główny Inspektorat Farmaceutyczny (GIF), Główny Inspektorat Farmaceutyczny Departament Inspekcji ds. Wytwarzania oraz Głównego Lekarza Weterynarii (GLW) dla próbek produktów leczniczych i produktów leczniczych weterynaryjnych. Praca podlegająca corocznej ocenie audytorskiej, zarówno wewnętrznej, jak i zewnętrznej, przez GIF oraz audytów z Europejskiego Dyrektariatu Jakości Leków (EDQM, ang. *The European Directorate for the Quality of Medicines*) w ramach Sieci Państwowych Laboratoriów Kontroli Produktów Leczniczych będącego odpowiednikiem Official Medicines Control Laboratory (OMCL), koordynowaną przez EDQM, agendę Rady Europy.
- Członek grupy eksperckiej do spraw Mikrobiologii Komisji Farmakopei,
- Członek Rady Naukowej Narodowego Instytutu Leków, kadencja 2016-2017,
- Członek Rady Naukowej Narodowego Instytutu Leków, kadencja 2017-2021,
- Zastępca sekretarza Rady Naukowej NIL, kadencja 2017-2021,
- Członek stały Komisji Rady Naukowej ds. Ekonomiczno-Finansowych,
- Członek stały Komisji Rady Naukowej ds. Statutowo-Regulaminowych,
- Członek zespołu ds. opracowywania projektu Kodeksu Etyki Pracowników NIL,
- Zastępca Kierownika Technicznego NIL w dziedzinie Elektroforeza.

Działalność ekspercka

- Ocena dokumentacji chemicznej, farmaceutycznej i biologicznej produktu leczniczego chemicznego w ramach umowy z Urzędem Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPLW MiPB), złożonej w związku z dostosowaniem do wymogów aktualnie obowiązującego prawa na etapie rejestracji, re-rejestracji, harmonizacji oraz dokumentacji złożonej w procesie zmian w pozwoleniu i dokumentacji dotyczącej wprowadzenia do obrotu produktu leczniczego, zarówno typu I, jak i i typu II;
- Ocena dokumentacji dotyczącej biorównoważności złożonej w związku z dostosowaniem do wymogów aktualnie obowiązującego prawa;

- Ocena zgłoszeń pojedynczych przypadków działań niepożądanych produktów leczniczych.

Członkostwo w towarzystwach naukowych

- Członek Zwyczajny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów;
- Członek Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (PTFarm).

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Wykłady na seminariach NIL;

- 28.05.2002 – Charakterystyka chinolonów.
- 03.06.2003 – Oksazolidynony – nowa grupa chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych.
- 01.06.2004 – Daptomycyna, pierwszy antybiotyk lipopeptydowy – możliwości terapeutyczne.
- 20.11.2007 – Chiralne rozdzielanie Linezolidu, pierwszego oksazolidynonu.
- 31.03.2009 – Optymalizacja metod elektroforezy kapilarnej stosowanych w badaniu produktów leczniczych zawierających wybrane antybiotyki.
- 24.10.2018 – Badanie mechanizmów rozdzielania chiralnego nowych pochodnych oksazolidynonów.

Wykłady w ramach działalności Sekcji Chemioterapii Polskiego Towarzystwa Lekarskiego;

- 09.12.2003 – Oksazolidynony – charakterystyka nowej grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych.
- 18.06.2004 – Daptomycyna – pierwszy antybiotyk lipopeptydowy – możliwości terapeutyczne.

Wykłady w ramach seminarium wydziałowego - Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny;

- 07.03.2018 – Badanie mechanizmów rozdzielania chiralnego nowych pochodnych oksazolidynonów.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- **18** prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR). W **12** pracach byłam pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.
- **13** prac przeglądowych, z czego **3** opublikowane zostały w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, a **10** w czasopismach krajowych, innych niż znajdujące się w bazie JCR, w **11** byłam pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.
- **22** streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych, w tym, wykład i przewodnictwo sesji podczas Ehrlich II. 2nd World Conference on Magic Bullets, Nürnberg, Germany, 03-05.10.2008.
- sumaryczny impact factor, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi IF - **58,001**; łączna punktacja MNiSW – **582**.
- liczba cytowanych publikacji według Web of Science TM Core Collection z dnia 02.01.2018 roku (bez autocytowań) – **301**.
- indeks Hirscha (h) według Web of Science TM Core Collection z dnia 02.01.2018 roku - **11**.