

# AUTOREFERAT

*Badanie struktur wybranych produktów naturalnych i wpływu ich modyfikacji na aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą*

dr Krystian Pyta



**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Wydział Chemii**

**Poznań, 2023 rok**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	3
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego .....	3
4.2 Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej.....	3
4.3 Omówienie najważniejszych osiągnięć zawartych w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego .....	7
4.3.1 Synteza i aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych gossypolu – wstęp, cel pracy i omówienie najważniejszych osiągnięć (H1).....	8
4.3.2 Rifampicyna i jej aminowe analogi - wstęp, cel pracy i omówienie najważniejszych osiągnięć	13
4.3.3 Podsumowanie.....	38
4.3.4 Wykaz użytych skrótów w kolejności alfabetycznej.....	40
4.3.5 Spis cytowanej literatury.....	40
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	43
5.1 Współpraca z naukowcami z krajowych oraz zagranicznych ośrodków badawczych.....	44
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę.....	45
7. Pozostałe istotne informacje dotyczące pracy naukowej .....	51
7.1 Dorobek naukowy .....	51
7.2 Granty i projekty naukowe.....	57
7.3 Nagrody i wyróżnienia.....	58
7.4 Plany na przyszłość.....	58

## 1. Imię i nazwisko

Krystian Pyta

ORCID ID: 0000-0001-5250-9990

Web of Science Researcher ID: D-7340-2011

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2012 doktor nauk chemicznych; tytuł pracy doktorskiej: „*Synteza i struktura nowych aminowych analogów ansamycynowego antybiotyku rifampicyny*”; Zakład Biochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; promotor pracy doktorskiej: prof. dr hab. Piotr Przybylski; **praca doktorska wyróżniona przez Radę Wydziału Chemii UAM**

2008 magister chemii; tytuł pracy magisterskiej: „*Synteza, struktura i właściwości kompleksujące nowych aza-pochodnych gossypolu*”; Zakład Biochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; promotor pracy magisterskiej: prof. dr hab. Bogumił Brzezinski

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

10.2012–obecnie adiunkt; Zakład Chemii Produktów Naturalnych, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

10.2008-06.2012 studia doktoranckie; Zakład Biochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

## 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

### 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Badanie struktur wybranych produktów naturalnych i wpływu ich modyfikacji na aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą.

### 4.2 Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą postępowania habilitacyjnego jest cykl 8 publikacji naukowych (**H1–H8**). Praca **H1** jest wynikiem realizacji grantu „IUVENTUS PLUS” 0366/IP3/2013/72, którego byłem kierownikiem. Publikacje naukowe wchodzące w skład niniejszego cyklu zostały zestawione w kolejności omawianej w autoreferacie, a nie zgodnie z rokiem ich wydania. Kopie prac **H1–H8** stanowiących cykl publikacji, jak również oświadczenia współautorów opisujące ich indywidualny, merytoryczny udział w powstaniu tych prac stanowią odpowiednio załącznik nr 5 oraz 6.

nr	publikacja	Współczynnik wpływu (IF) wg bazy JCR		Punkty MNiSW**
		rok wydania	5-letni***	
H1	<p><b>Pyta K.*</b>, Blecha M., Janas A., Klich K., Pecyna P., Gajecka M., Przybylski P.            „Synthesis, structure and antimicrobial evaluation of a new gossypol triazole conjugates functionalized with aliphatic chains and benzyloxy groups”  <i>Bioorg. Med. Chem. Lett</i>, 26 (17), (2016), 4322-4326            DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.07.033, <a href="#">link</a></p> <p>Mój udział polegał na zaprojektowaniu i opracowaniu metod syntezy nowych pochodnych gossypolu, charakterystyce spektroskopowej otrzymanych związków, opracowaniu i wzięciu udziału w wykonaniu testów sprawdzających poziom ergosterolu w grzybach, brałem udział w pisaniu manuskryptu i suplementu, byłem odpowiedzialny za proces recenzji.</p>	2,454	2,6	70
H2	<p>Przybylski P.* , <b>Pyta K.</b>, Klich K., Schilf W., Kamiński B.            „<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N CP/MAS, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N SCT CP/MAS and FTIR spectroscopy as tools for ualitative detection of the presence of zwitterionic and nonionic forms of ansa-macrolide 3-formylrifamycin SV and its derivatives in solid state”  <i>Magn. Reson. Chem.</i> 52 (1-2), (2014), 10-21            DOI: 10.1002/mrc.4028, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy i pisaniu manuskryptu, przygotowałem suplement, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników.</p>	1,179	1,8	40
H3	<p><b>Pyta K.</b>, Klich K., Domagalska J., Przybylski, P.*            „Structure and evaluation of antibacterial and antitubercular properties of new basic and heterocyclic 3-formylrifamycin SV derivatives obtained via 'click chemistry' approach”  <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 84, (2014), 651-676            DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.07.066, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, opracowałem metodę syntezy pochodnych</p>	3,447	6,5	200

	i uczestniczyłem w otrzymaniu pochodnych triazolowych i heterocyklicznych, wykonałem testy reakcji cykloaddycji Huisgena, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników w tym analizie SAR.			
<b>H4</b>	<p>Czerwonka D., Domagalska J., <b>Pyta K.</b>, Kubicka M.M., Pecyna P., Gajecka M., Przybylski P.*</p> <p>„Structure-activity relationship studies of new rifamycins containing l-amino acid esters as inhibitors of bacterial RNA polymerases”</p> <p><i>Eur. J. Med. Chem.</i>, 116, (2016), 216-221</p> <p>DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.03.061, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników.</p>	4,519	6,5	200
<b>H5</b>	<p><b>Pyta K.</b>, Janas A., Szukowska M., Pecyna P., Jaworska M., Gajecka M., Bartl F., Przybylski P.*</p> <p>„Synthesis, docking and antibacterial studies of more potent amine and hydrazone rifamycin congeners than rifampicin”</p> <p><i>Eur. J. Med. Chem.</i>, 167, (2019), 96-104</p> <p>DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.009, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, uczestniczyłem w otrzymaniu i oczyszczaniu pochodnych, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników w tym analizie SAR. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie suplementu.</p>	5,573	6,5	200
<b>H6</b>	<p><b>Pyta K.</b>, Przybylski P.*, Bartl, F.</p> <p>„Regioselective long-range proton transfer in new rifamycin antibiotics: A process in which crown ethers act as stronger brønsted bases than amines”</p> <p><i>ChemPhysChem</i>, 16 (5), (2015), 938-942</p> <p>DOI: 10.1002/cphc.201402892, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, uczestniczyłem w otrzymaniu i oczyszczaniu pochodnych, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników przygotowywałem związki do analizy</p>	3,138	3,0	100

	i wykonywałem widma FT-IR. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie suplementu.			
<b>H7</b>	<p>Przybylski P.*, <b>Pyta K.</b>, Czerwonka D., Kubicka M.M., Gajecka, M.</p> <p>„The effect of complexation of 3-formylrifamycin SV macrocyclic ether derivatives with metal cations and small nitrogen-containing organic molecules on antibacterial activity against <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>”</p> <p><i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 25 (18), (2015), 3903-3909</p> <p>DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.07.043, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, uczestniczyłem w otrzymaniu i oczyszczeniu pochodnych, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników w tym analizie SAR, przygotowywałem związki do analizy i wykonywałem widma FT-IR. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie suplementu.</p>	2,486	2,6	70
<b>H8</b>	<p><b>Pyta K.</b>, Janas A., Skrzypczak N., Schilf W., Wicher B., Gdaniec M., Bartl F., Przybylski P.*</p> <p>„Specific Interactions between Rifamycin Antibiotics and Water Influencing Ability To Overcome Natural Cell Barriers and the Range of Antibacterial Potency”</p> <p><i>ACS Infectious Diseases Article</i> 5(10), (2019), 1754-1763</p> <p>DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00176, <a href="#">link</a></p> <p>Brałem udział w opracowaniu koncepcji pracy, pisaniu manuskryptu i w procesie recenzji, brałem udział w charakterystyce spektroskopowej związków i dyskusji wyników, przygotowywałem związki do analizy i wykonywałem widma FT-IR. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie suplementu.</p>	4,614	5,1	100
<b>Średnia wartość /publikację</b>		<b>3,426</b>	<b>4,325</b>	<b>122,5</b>

**Dane naukometryczne – stan na wrzesień 2023 roku**

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) dla czasopism, w których ukazały się prace <b>H1-H8</b>	<b>27,41</b>
Sumaryczny współczynnik wpływu (IF <sub>5-letni</sub> ) dla czasopism, w których ukazały się prace <b>H1-H8</b> (w 2022 roku) wg bazy JCR	<b>34,6</b>
Sumaryczna liczba punktów, w których ukazały się prace <b>H1-H8</b> na podstawie wykazu czasopism punktowanych przez MNiSW (za 2023 rok)	<b>980</b>
Ogólna liczba prac naukowych w których jestem współautorem z listy JCR	<b>40</b>
Indeks Hirsha wg bazy Web of Science	<b>13</b>
Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science	<b>758</b>
Liczba cytowani bez autocytowań wg bazy web of Science	<b>673</b>

**4.3 Omówienie najważniejszych osiągnięć zawartych w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego**

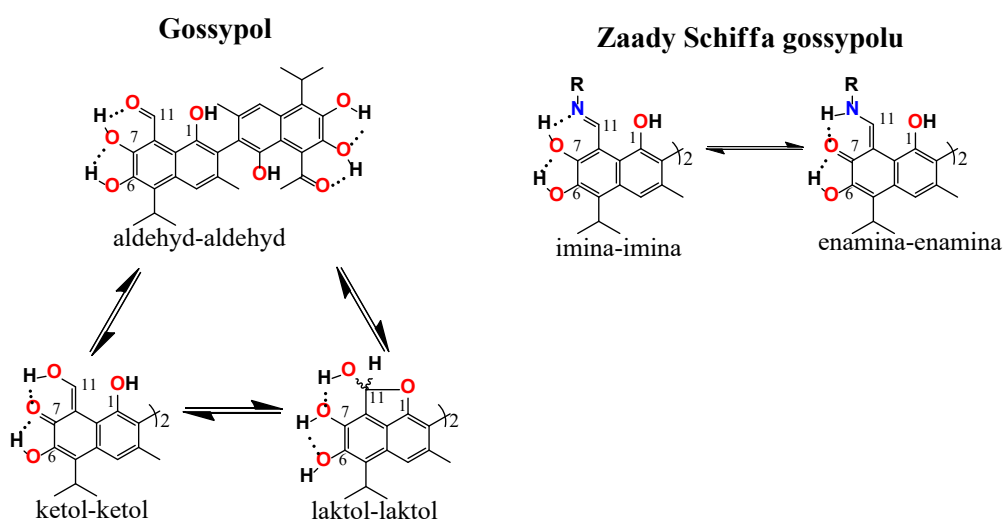
Przedstawiona rozprawa habilitacyjna pod tytułem: „Badanie struktur wybranych produktów naturalnych i wpływu ich modyfikacji na aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybiczą” obejmuje cykl 8 prac (**H1–H8**) opublikowanych po nadaniu stopnia naukowego doktora. Pierwsza z nich (**H1**) opisuje wpływ modyfikacji naturalnego biseskwiterpenu – gossypolu na aktywność przeciwgrzybiczą tej grupy związków oraz rzuca światło na ich mechanizm działania na grzyby. W pracy **H2** przedstawione zostały wyniki, które ukazują, że rifampicyna (**Rif**) może występować w ciele stałym w postaci różnych form struktur, co może mieć wpływ na proces oznaczania tych antybiotyków w sposób ilościowy jak i jakościowy. W pracach **H3-H7** zostały zaprezentowane wyniki badań eksperymentalnych obejmujące syntezę nowych analogów rifampicyny oraz korelację ich aktywności przeciwbakteryjnej ze strukturami otrzymanych pochodnych. Z kolei w pracy **H8** zostały opisane równowagi konformacyjne, które można zaobserwować w grupie związków ansamycynowych i wykazana została kluczowa rola cząsteczek wody w stabilizacji tych struktur.

W niniejszym opracowaniu nie zostało zawarte pełne omówienie wszystkich uzyskanych wyników, stanowi ono zwięzłą charakterystykę i przedstawia obszar eksperymentalny badań oraz dotyczy merytorycznego ujęcia kluczowych osiągnięć spełniających kryterium nowości naukowej. Wszelkie szczegóły metodologiczne, dane liczbowe (w tym z badań krystalograficznych, biologicznych i teoretycznych), rysunki, tabele,

widma itd. zawarte są w załączonych publikacjach oraz w materiałach uzupełniających, które stanowią załącznik 7. Prace wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej oznaczono symbolami [H1–H8], a pozostałe cytowane publikacje zostały ponumerowane według kolejności ich występowania i zamieszczone jako „Spis cytowanej literatury” w dalszej części autoreferatu. Wykaz użytych skrótów wraz z ich wyjaśnieniem znajduje się z kolei w podrozdziale 4.3.4.

### 4.3.1 Synteza i aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych gossypolu – wstęp, cel pracy i omówienie najważniejszych osiągnięć (H1)

Gossypol (Schemat 1) jest biseskwiterpenem o interesujących właściwościach fizykochemicznych i obiecującej aktywności biologicznej.<sup>1</sup> Ze względu na obecność sprzężonej grupy aldehydowej z układem polifenolowym związek ten może występować w postaci trzech tautomerów: aldehydowo-aldehydowego, laktolowo-laktolowego oraz ketolowo-ketolowego (Schemat 1).<sup>1</sup> Z kolei z powodu zahamowanej rotacji wokół wiązania C(2)-C(2') cząsteczka gossypolu na skutek zjawiska zwanego atropoizomerią może występować w postaci dwóch enancjomerów o różnej aktywności biologicznej.<sup>1,2</sup> O tym jak wielki potencjał farmakologiczny wykazuje gossypol doskonale świadczy liczba ponad dwóch tysięcy publikacji naukowych donoszących o możliwości zastosowania tego związku, jak i jego pochodnych – zasad Schiffa w farmacji i medycynie. Gossypol jest potencjalnym lekiem antykoncepcyjnym dla mężczyzn, gdyż powoduje czasową bezpłodność u mężczyzn.<sup>3</sup>

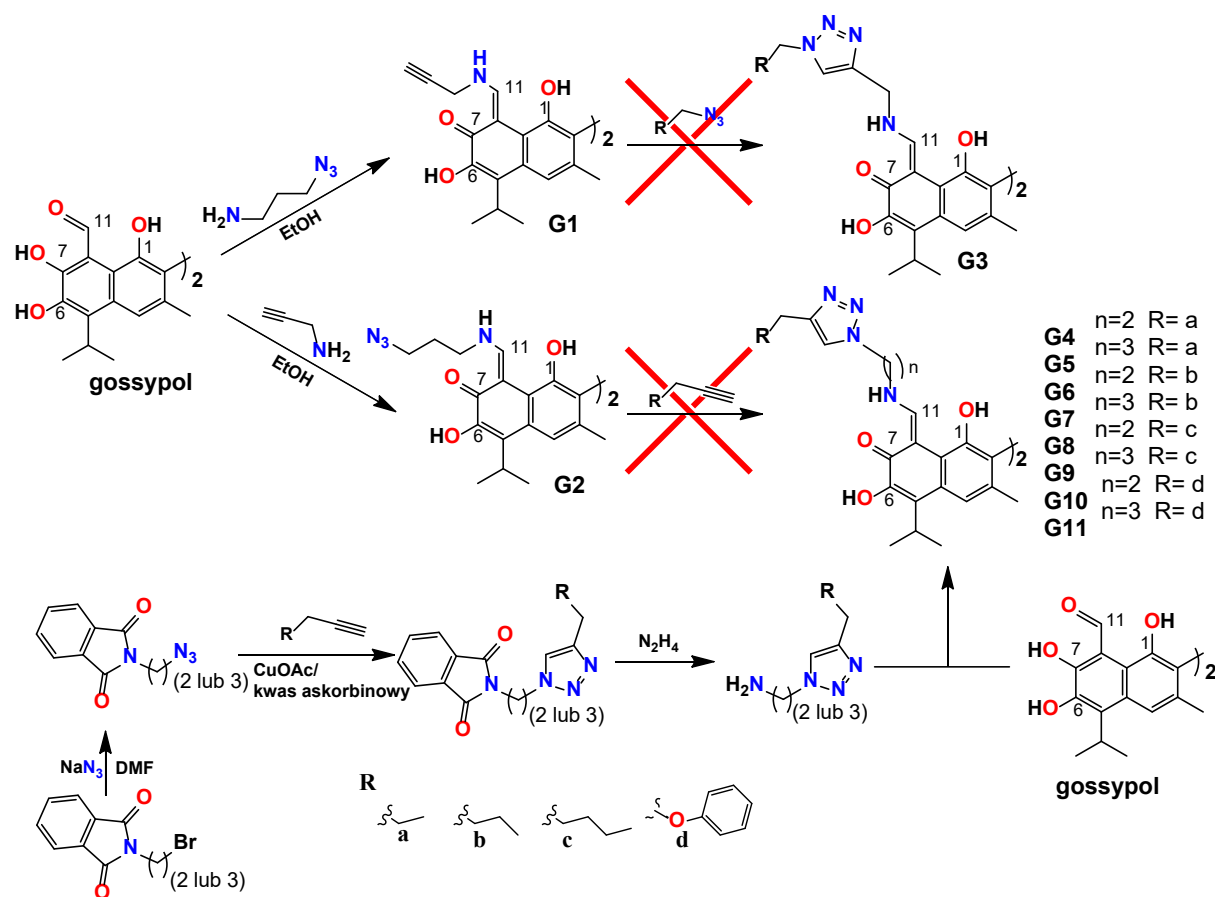


Schemat 1 Struktura i formy tautomeryczne gossypolu i jego zasad Schiffa.



Wykazuje on także znakomite właściwości antynowotworowe,<sup>4</sup> a także działanie antymalaryczne<sup>5</sup>. Jest także potencjalnym lekiem zwalczającym wirusa HIV, a mechanizm tego działania jest związany z inhibicją odwrotnej transkryptazy wirusa HIV.<sup>6,7</sup> Badania nad syntezą i potencjalnym zastosowaniem zasad Schiffa i hydrazonów gossypol w farmacji i rolnictwie, w których brałem udział, wykazały, że tego typu pochodne wykazują działanie zarówno przeciwbakteryjne<sup>8</sup> jak i przeciwgrzybicze<sup>9</sup>. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano w przypadku badań przeciwgrzybiczych na grzyby z rodziny *Fusarium*.<sup>9</sup> Grzyby te są prawdziwą „zmorą” rolników i sadowników, ponieważ są one odpowiedzialne w znacznym stopniu za niszczenie upraw. Pochodne gossypolu wykazywały dużo wyższą aktywność przeciwko tym grzybom – widocznie hamując ich wzrost, w porównaniu do samego gossypolu.<sup>9</sup> Z kolei w przypadku badań przeciwbakteryjnych okazało się, że pochodne zawierające w swojej strukturze podstawniki heteroaromatyczne charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwbakteryjną niż gossypol.<sup>8</sup> Mimo tak szerokiego spektrum aktywności biologicznej, gossypol ze względu na wysoką toksyczność nie może być stosowany jako lek, a za toksyczność cząsteczki gossypolu odpowiedzialna jest obecność dwóch grup aldehydowych zdolnych do wiązania z białkami i enzymami (**Schemat 1**).<sup>10</sup>

Do czasu publikacji pracy **H1** opisano w literaturze wiele zasad Schiffa, hydrazonów i oksymów gossypolu jednakże w tej bibliotece związków nie było pochodnych zawierających koniugaty pochodnych gossypolu z układami triazolowymi.<sup>1</sup> Układy triazolowe znane są z właściwości przeciwgrzybiczych,<sup>11,12</sup> a zatem połączenie szkieletu cząsteczki gossypolu z grupą triazolową mogło wpłynąć na ich wzajemną kooperację i w znaczny sposób wpłynąć na właściwości przeciwgrzybicze nowych pochodnych gossypolu. W celu otrzymania nowych koniugatów enaminowych gossypolu z układami triazolowymi podstawionymi grupami alifatycznymi i aromatycznymi chciałem najpierw otrzymać zasady Schiffa gossypolu z wybranymi aminami zawierającymi ugrupowanie propargilowe lub azydkowe (**Schemat 2**). Następnie grupy te miały zostać wykorzystane do przeprowadzenia reakcji 1,4-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, która prowadziła do otrzymania pożądaných związków (**G3-G11**). Niestety, o ile pierwszy etap przebiegł pomyślnie, o tyle problem pojawił się na etapie próby otrzymania układów triazolowych. Zwiększenie ilości katalizatora oraz wydłużenie czasu reakcji nie dawało satysfakcjonujących rezultatów. Obecność w strukturach związków **G1** i **G2** aminowego atomu azotu i atomów tlenu w pozycjach C(1) i C(1') sprzyjała tworzeniu kompleksu z kationami miedzi Cu<sup>+</sup> i w ten sposób uniemożliwiała utworzenie stanu



Schemat 2 Strategie syntetyczne mające prowadzić do otrzymania nowych zasad Schiffa gossypolu zawierających układ triazolowy.

przejściowego w reakcji cykloaddycji. Z tego powodu musiała ulec zmianie strategia otrzymywania triazolowych koniugatów gossypolu na przeprowadzenie reakcji dipolarnej cykloaddycji Huisgena przed połączeniem całego szkieletu aminowo-triazolowego z gossypolem (**Schemat 2**). W tym celu użyte zostały odpowiednie bromki ftalimidowe, które najpierw zostały przekształcone w odpowiednie azydki, następnie wprowadzona grupa funkcyjna została przekształcona w ugrupowania triazolowe zawierające wybrany podstawnik. Kolejnym krokiem było odblokowanie grupy aminowej i docelowa reakcja kondensacji z cząsteczką gossypolu. Otrzymane w ten sposób aminowe pochodne gossypolu **G4-G11** zostały przebadane spektroskopowo w celu potwierdzenia ich struktury i poddane testom na aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą.

Testy wykonane na wybranych szczepach bakteryjnych ukazały, że tylko gossypol wykazywał aktywność na poziomie 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dla niemal wszystkich szczepów bakterii Gram-dodatnich. Z otrzymanych pochodnych jedynie ta zawierająca w swojej strukturze najkrótszy alkiłowy podstawnik (etyłowy) przy układzie triazolowym **G4** wykazywała aktywność na

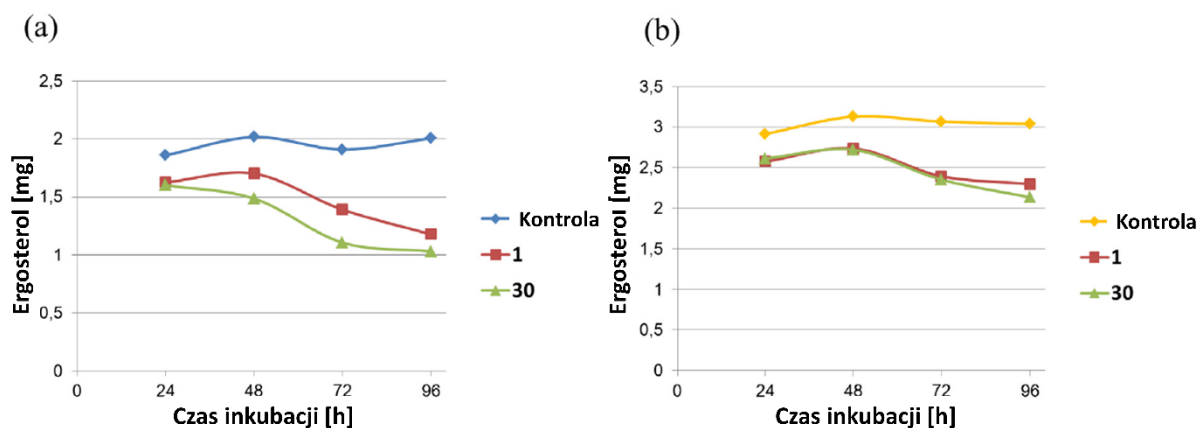
poziomie 256 µg/ml na szczepy bakterii *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus pneumoniae*. Z kolei, wyniki uzyskane w testach aktywności przeciwgrzybiczej, w porównaniu do wyników z testów aktywności przeciwbakteryjnej, wykazały nieco większe zróżnicowanie (Tabela 1). W przypadku trzech szczepów grzybów: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* i *Trichophyton mentagrophytes* uzyskane wartości MIC (w większości przypadków 256 µg/ml) wskazały, że grzyby te są częściowo wrażliwe na działanie otrzymanych pochodnych gossypolu (**G4**, **G6-G10**), jednak należy wziąć pod uwagę, że tylko w dwóch przypadkach ich aktywność była na poziomie MIC = 128 µg/ml. Nieco inaczej sytuacja wyglądała dla szczepu *Rhizopus stolonifer*, gdyż w przypadku poddania go na działanie związku **G10** jego wrażliwość na ten związek była wyższa (MIC = 64 µg/ml) (Tabela 1). Najciekawsze wyniki zostały jednak uzyskane dla grzybów z rodzaju *Fusarium oxysporum*, które zostały wyizolowane z kapusty i pomidorów. Na szczególną uwagę zasługują związki **G10** i **G11** (z układami benzyloksylowymi), dla których wartości MIC wyniosły 16 µg/ml i były one równe tym uzyskanym dla środka przeciwgrzybiczego jakim jest mikokonazol (Tabela 1).

Tabela 1 Zestawienie testów aktywności przeciwgrzybiczej i wartości logP dla gossypolu i jego pochodnych **G4-G11**. Wartości MIC podane są w µg/mL.

Szczep grzyba	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	<i>Rhizopus stolonifer</i> ATCC 56227b	<i>Fusarium acuminatum</i> ATCC 46651	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>betae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	logP <sub>calc</sub> *
Związek								
<b>gossypol</b>	256	256	128	128	128	32	32	6,68
<b>G4</b>	256	256	256	128	256	64	64	7,30
<b>G5</b>	---	---	---	---	---	64	64	7,84
<b>G6</b>	256	256	256	128	256	64	64	8,35
<b>G7</b>	256	256	256	128	256	64	64	8,67
<b>G8</b>	256	256	256	128	256	64	64	8,89
<b>G9</b>	256	256	256	128	256	64	64	9,09
<b>G10</b>	128	256	256	64	128	16	16	8,25
<b>G11</b>	---	---	---	---	---	16	16	8,60
<b>miconazole</b>	---	---	---	---	---	16	16	5,72

\*logP<sub>calc</sub> – wartości obliczone w *Molinspiration property engine v2013.0*, <http://www.molinspiration.com/>.

Istotnym elementem pracy **H1** było ustalenie/wskazanie potencjalnego enzymu lub procesu podatnego na działanie tych związków bezpośrednio wpływającego na zaburzenie prawidłowego rozwoju grzybów. Z doniesień literaturowych wiadomo, że gossypol zaburza przemianę kortyzonu w kortyzol poprzez inhibicję dehydrogenazy 11-beta-hydroxysteroidowej.<sup>13,14</sup> Z drugiej strony wiadomo, że w przypadku grzybów wiele czynników przeciwgrzybiczych zaburza metabolizm steroli, między innymi flukonazol.<sup>15,16</sup> Z tego powodu została postawiona hipoteza, że być może aktywność przeciwgrzybicza gossypolu oraz jego triazolowych pochodnych związana jest z inhibicją biosyntezy ergosterolu. Sprawdzenie tej hipotezy polegało na wykonaniu badań mających na celu określenie wpływu wybranych związków na poziom ergosterolu w komórkach grzybów (mg na 1 g wysuszonych grzybów). Analiza wykonanych testów dla szczepów *Rhizopus stolonifer* i *Fusarium acuminatum* poddanemu działaniu gossypolu i pochodnej **G10** ukazała, że dla trzech niezależnych pomiarów ilość ergosterolu w czasie malała, co wskazuje, że aktywność przeciwgrzybicza gossypolu i jego pochodnych była związana z zaburzeniem biosyntezy ergosterolu w komórkach grzybów (Rysunek 1).

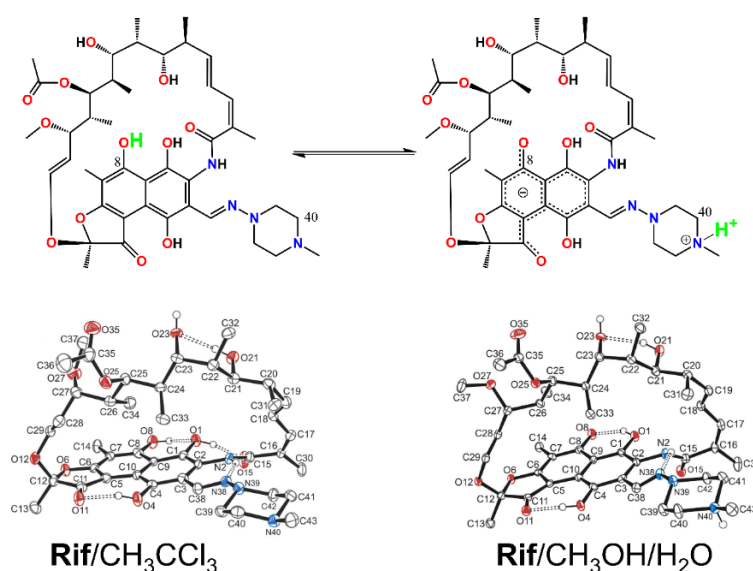


Rysunek 1 Ilość ergosterolu [mg/1 g suchej masy grzybów], produkowana pod wpływem gossypolu i **G10**, a) dla *R. stolonifer*; b) *F. acuminatum*.

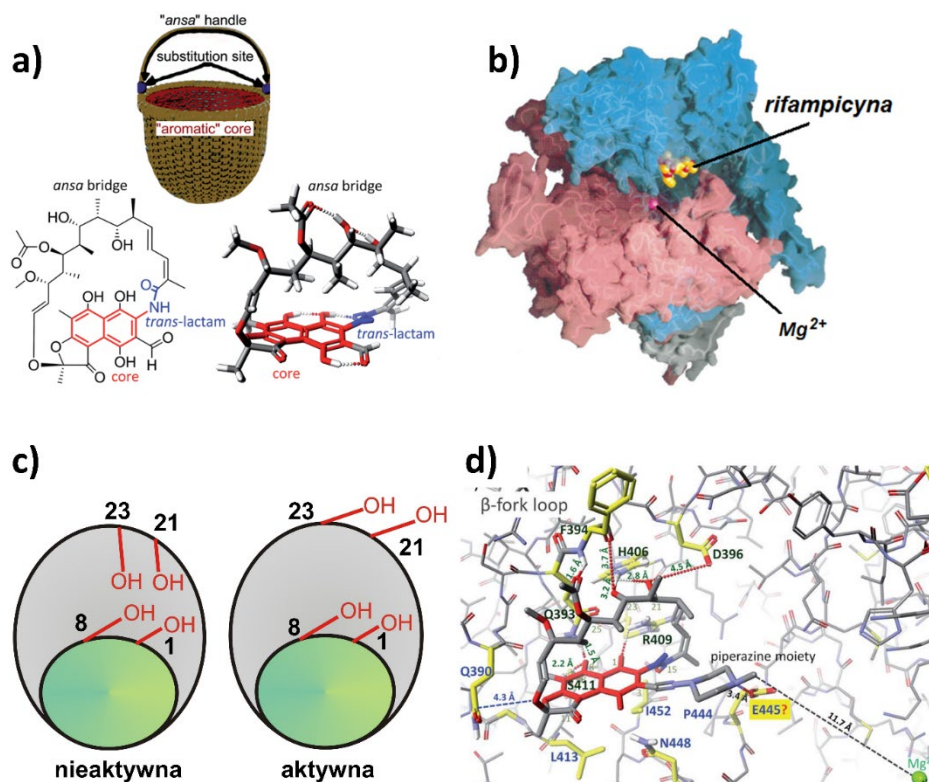
### 4.3.2 Rifampicyna i jej aminowe analogi - wstęp, cel pracy i omówienie najważniejszych osiągnięć

Rifampicyna (**Rif**, **RMP**) należy do grupy antybiotyków ansamycynowych, których nazwa pochodzi od charakterystycznej budowy ich cząsteczek (Schemat 3).<sup>17</sup> W strukturze tych antybiotyków wyróżnić można aromatyczny rdzeń i długi łańcuch alifatyczny (most ansamycynowy), łączący rdzeń przez niesąsiadujące atomy węgla (układu aromatycznego), dzięki czemu cząsteczka wygląda jak „uchwyt” (łacynskie „ansa” = angielskie „handle”) (Rysunek 2a). Struktura taka jest stosunkowo sztywna, co wpływa na unikalne właściwości chemiczne, w tym możliwość występowania zjawiska diastereoizomerii przez różne usytuowanie „mostu ansamycynowego” względem pierścienia aromatycznego i specyficzną aktywność biologiczną – szczególnie przeciwbakteryjną.

Rifampicyna jest półsyntetycznym antybiotykiem ansamycynowym o bardzo szerokim spektrum aktywności biologicznej. Jej mechanizm działania polega na blokowaniu bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA (RNAP) (Rysunek 2b i d), a jednym z kluczowych elementów strukturalnych odpowiedzialnym za efektywne oddziaływanie antybiotyku z RNAP jest orientacja grup hydroksylowych mostu ansamycynowego<sup>20</sup>. W przypadku tego elementu strukturalnego kluczowa jest orientacja dwóch grup hydroksylowych O(21)H i O(23)H, które muszą być skierowane na „zewnątrz”, gdyż tylko w ten sposób możliwe jest zrealizowanie wiązań wodorowych kluczowych w stabilizacji **Rif** w



Schemat 3 Struktura jonowa i niejonowa **Rif** oraz jej struktury krystalograficzne otrzymane w roztworze  $\text{CH}_3\text{CCl}_3$  i  $\text{CH}_3\text{OH}$ .<sup>18</sup>



Rysunek 2 a) Przykładowa budowa związków ansamycynowych na przykładzie 3-formylorifampicyny SV.<sup>17</sup>; b) Struktura kompleksu rifampicyna – bakteryjna polimeraza RNA.<sup>19</sup>; c) możliwe ułożenia grup hydroksylowych i fenolowych względem siebie; model wiązania Rif z RNAP *Thermus aquaticus*<sup>17</sup>.

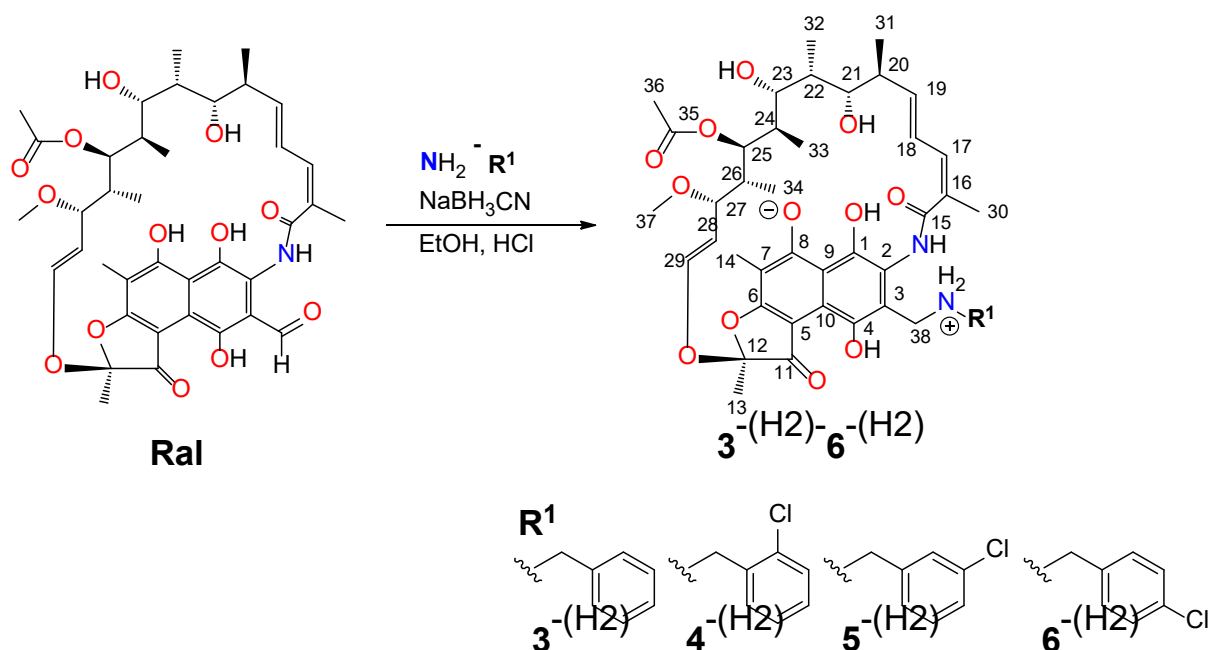
miejsu wiążącym RNAP (Rysunek 2c). Rifampicyna w ten sposób blokuje poprawną ekspresję genów w komórkach bakterii uniemożliwiając ich właściwy rozwój, a na podstawie wielu badań dowiedziono, że antybiotyk ten hamuje proces transkrypcji na jego początkowym etapie<sup>21,22</sup>. Jest to lek pierwszego wyboru w przypadku poważnych przypadków klinicznych wywołanych przez prątki gruźlicy, atypowe i trądu, **Rif** jest również stosowana w stanach septycznych wywołanych przez różne patogeny.<sup>19</sup> Problem z zastosowaniem tego antybiotyku polega na jego stosunkowo wysokiej hepatotoksyczności oraz mechanizmach obronnych wykształczanych przez bakterie, które prowadzą do lekooporności. Jednym z mechanizmów obronnych prowadzących do uodparniania się szczepów bakterii na ten antybiotyk jest modyfikacja struktury polimerazy RNA przez podstawienie niektórych aminokwasów wchodzących w skład miejsca wiązania cząsteczek inhibitorów. Innym sposobem uodparniania się bakterii są różnego rodzaju modyfikacje chemiczne struktury tego antybiotyku.<sup>23</sup> Z tego powodu poszukuje się jego nowych analogów odpornych na procesy dezaktywacji prowadzone przez bakterie.

Bakterie uodparniają się na **Rif** między innymi przez hydrolizę wiązania hydrazonowego, co wskazuje na jego istotną rolę przy wiązaniu się z RNAP. Celem omawianych prac było otrzymanie, na drodze reakcji aminowania redukcyjnego, nowych aminowych analogów rifampicyny zawierających w swojej strukturze zróżnicowane grupy funkcyjne. Podłączenie podstawnika przy atomie węgla C(3) poprzez ugrupowanie aminowe skutkowało brakiem podatności na hydrolizę prowadzoną przez bakterie. Ważnym było również ustalenie struktur aminowych analogów **Rif** w różnych rozpuszczalnikach i ich porównanie ze strukturą **Rif**. Analiza wyników badań aktywności przeciwbakteryjnej w połączeniu z informacjami dotyczącymi struktury tej grupy pochodnych miała na celu ustalenie zależności struktura-aktywności (SAR) dla tego typu ansamycyn.

Pomimo tego, że struktura **Rif** była znana od wielu dziesięcioleci, to do czasu opublikowania, w roku 2012, przez nasz zespół badawczy wyników odnośnie możliwości występowania tego antybiotyku w dwóch formach w roztworze jak i ciele stałym,<sup>18,24</sup> nie było żadnych wzmianek w literaturze na ten temat. W pracach tych wykazano, że w roztworach aprotycznych i przy krystalizacji **Rif** z takich roztworów antybiotyków tek występuje w formie niejonowej (Schemat 3). Natomiast w roztworach protycznych i przy wykorzystaniu takich roztworów do krystalizacji **Rif** zachodzi przeniesienie protonu z grupy fenolowej O(8)-H na piperazynowy atom azotu N(43) ugrupowania hydrazonowego, co implikuje, że **Rif** występuje w formie zwiterjonowej (Schemat 3). Fakt ten, ma kluczowe znaczenie w stabilizacji antybiotyku w miejscu wiążącym bakteryjnej polimerazy RNA. Obecność protonowanego atomu azotu N<sup>+</sup>(40)-H umożliwia dodatkową stabilizację **Rif**, w trakcie tworzenia kompleksu z RNAP, dzięki utworzeniu oddziaływania z ujemnie naładowaną resztą konserwatywnego glutaminianu E<sub>445</sub> (Rysunek 2d).

#### 4.3.2.1 Omówienie pracy H2

Biorąc pod uwagę możliwość występowania **Rif** w dwóch formach w roztworze (niejonowej i jonowej) ciekawym było zbadanie, czy w ciele stałym te dwie formy **Rif** również będą obserwowane w badaniach CP/MAS/NMR. Do czasu publikacji wyników w pracy **H2** w literaturze były opisane badania NMR **Rif** w ciele stałym, ale autorzy w tych badaniach nie zwrócili uwagi na możliwość występowania tego związku w dwóch formach<sup>25</sup> lub jakość wykonanych widm NMR w ciele stałym nie była wystarczająca do wyciągnięcia konstruktywnych wniosków<sup>26</sup>. Do badania struktur farmaceutyków w ciele stałym doskonale

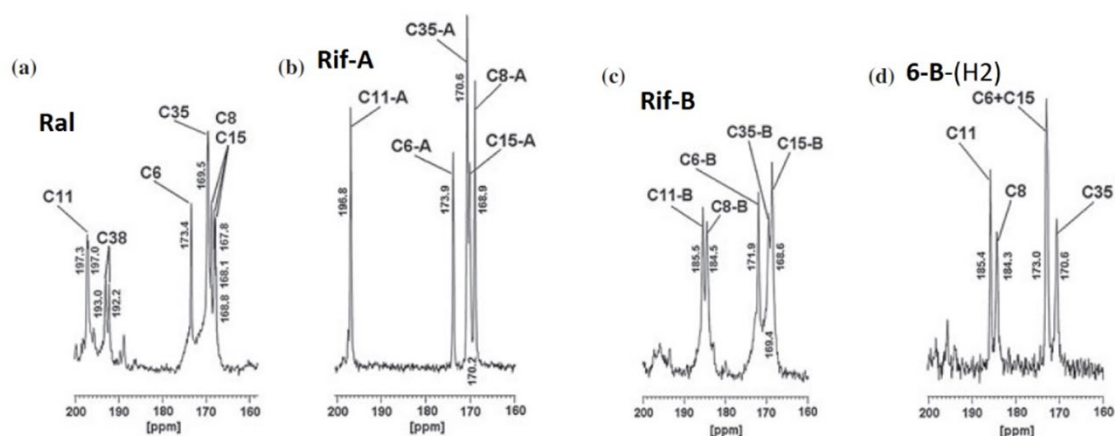


Schemat 4 Schemat syntezy aminowych analogów Rif.

nadaje się nowoczesna technika spektroskopowa CP/MAS/NMR.<sup>27,28</sup> W pracy **H2** do ustalenia struktur w ciele stałym 3-formylorifamycyny SV (**Ral**), **Rif** i czterech pochodnych **Ral** (Schemat 4) zostały wykorzystane techniki spektroskopowe <sup>13</sup>C i <sup>15</sup>N CP/MAS oraz FT-IR. Wyniki te następnie zostały użyte w celu sprawdzenia ich możliwego wykorzystania w analizie jakościowej **Rif** w ciele stałym.

W strukturze **Ral** obecny jest tylko jeden atom azotu N(2) jednak ze względu na charakter chemiczny (laktam) nie może on uczestniczyć w wewnątrzcząsteczkowym przenoszeniu protonu z grupy fenolowej O(8)H, zatem ta cząsteczka była idealnym punktem odniesienia dla formy niejonowej rifamycyn w badaniach CP/MAS. Z kolei aminowe analogi **Rif** w roztworze, niezależnie od użytego rozpuszczalnika, występowały w formie zwitterjonowej z protonowanym atomem azotu N<sup>+</sup>(38)-H i układem fenolanowym w pozycji C(8) rdzenia naftalenowego, były bardzo dobrym modelem do obserwacji formy jonowej rifamycyn w ciele stałym. Z wcześniejszych badań wiadomo, że krystalizacja **Rif** z rozpuszczalników aprotycznych pozwala uzyskać kryształy, w których antybiotyk ten występuje wyłącznie w formie niejonowej, podczas gdy krystalizacja z układów protycznych prowadzi do uzyskania w ciele stałym formy jonowej.<sup>18</sup> W tym miejscu należy podkreślić, że w strukturach krystalograficznych obecne są cząsteczki rozpuszczalników i swoją obecnością stabilizują odpowiednie formy **Rif**, co więcej wiadomo, że obie formy **Rif** mogą ulegać wzajemnym





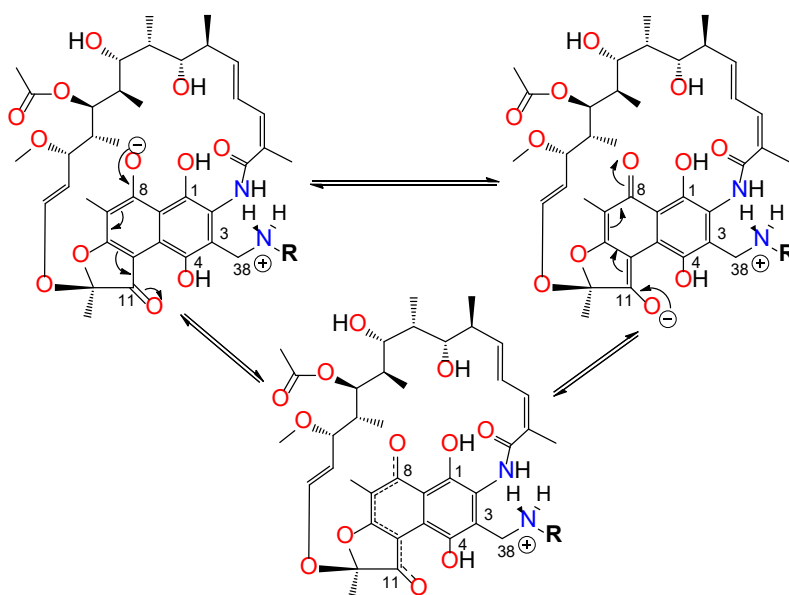
Rysunek 3 Porównanie fragmentów widm  $^{13}\text{C}$  CP/MAS dla **Ral**, **Rif-A** (proszek z kryształów z  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$ ), **Rif-B** (proszek z kryształów z  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) i pochodnej **6-B**.

przekształceniom w siebie między innymi poprzez przenoszenie omawianego związku z koniecznością przekształcenia obu typów kryształów w proszek (do pomiarów CP/MAS) nie spowoduje zmiany formy jonowej w stosunku do wyjściowych kryształów **Rif**. Analiza wyników uzyskanych w widmach CP/MAS dowiodła, że w przypadku **Ral** i proszku **Rif** uzyskanego z kryształów w  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$  grupa karbonylowa C(11)=O zachowuje swój charakter nienasycony ponieważ częstość rezonansowa dla tego atomu węgla w obu widmach  $^{13}\text{C}$  NMR wynosiła powyżej 195 ppm (Rysunek 3a i b). Również pozostałe sygnały od grup karbonylowych w widmach  $^{13}\text{C}$  CP/MAS notowane były przy podobnych wartościach przesunięcia chemicznego. Dane uzyskane z eksperymentów NMR w ciele stałym pokrywają się z tymi uzyskanymi dla zarejestrowanego widma  $^{13}\text{C}$  NMR **Rif** w niepolarnym rozpuszczalniku –  $\text{CDCl}_3$  (Tabela 1 w pracy **H2**). Sytuacja wygląda inaczej w przypadku pomiarów widm  $^{13}\text{C}$  NMR w ciele stałym dla proszku uzyskanego z kryształów **Rif** w metanolu i aminowych analogów **Rif** i jest ona analogiczna do wyników obserwowanych w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR **Rif** wykonanym w roztworze  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Tabela 1 w pracy **H2**). W tych przypadkach brak jest charakterystycznego sygnału od ketonowego atomu węgla C(11) powyżej 195 ppm (Rysunek 3c i d). Sygnał ten w omawianych przypadkach jest silnie ekranowany i widoczny poniżej 190 ppm, z kolei wartość rezonansowa dla atomu węgla C(8) jest wyższa i ma to związek z efektem odsłaniającym związanym z silnym zjawiskiem rezonansu między grupą fenolanową C(8) $\text{O}^-$  a grupą karbonylową C(11)O (Schemat 5). Podobne różnice widoczne są niemal w całym zakresie spektralnym, co jest również widoczne w wartościach przesunięć chemicznych zarejestrowanych dla atomów azotu w widmach  $^{15}\text{N}$  CP/MAS/NMR (Tabela 2). Szczególnie istotne z punktu widzenia procesu przeniesienia

Tabela 2 Wartości przesunięć chemicznych w ciele stałym  $^{15}\text{N}$  NMR dla **Ral**, **Rif-A** (proszek z kryształów z  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$ ), **Rif-B** (proszek z kryształów z  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) i pochodnej **6-B**.

Atom azotu	<b>Ral</b> CP/MAS (proszek)	<b>Rif-A</b> CP/MAS (kryształ <b>Rif</b> z $\text{CH}_3\text{Cl}_3$ )	<b>Rif-b</b> CP/MAS (kryształ <b>Rif</b> z $\text{CH}_3\text{OH}$ )	<b>6-(H2)</b> CP/MAS (proszek)	<b>6-(H2) + KOH</b> CP/MAS (proszek)
N15	-250,7*	-241,4*	-248,3*	-252,2*	-257,4*
N38	---	-42,3	-32,3	-331,1*	-338,4*
N39	---	-253,4	-261,8	---	---
N43	---	-343,4	-336,1*	---	---

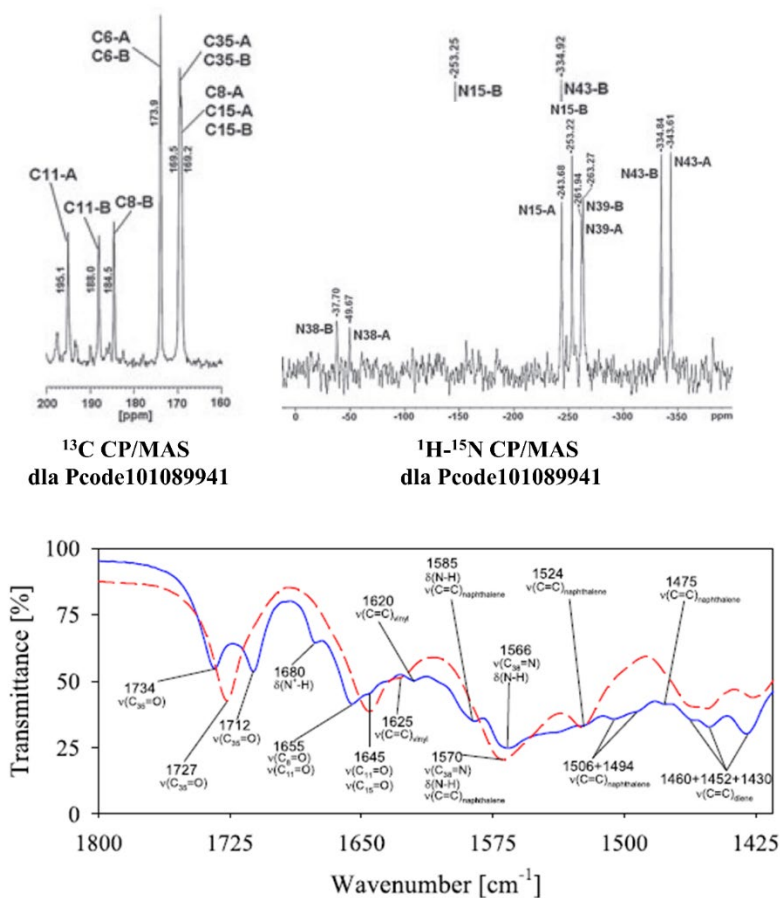
\* Sygnały obserwowane w eksperymencie  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SCT CP/MAS



Schemat 5 Zjawisko rezonansu w strukturach jonowych rifamycyn na przykładzie

protonu są wartości przesunięć chemicznych zarejestrowane dla atomu azotu N(43), dla którego wartość rezonansowa po protonacji jest wyższa o 7,3 ppm i potwierdza zlokalizowanie na tym atomie azotu N(43) protonu przeniesionego z grupy fenolowej O(8)H w formie jonowej **Rif**. Potwierdzeniem powyższego stwierdzenia jest eksperyment wykonany dla jednej z pochodnych aminowych **Ral**, dla której po deprotonacji atomu azotu N(38) dochodzi do obniżenia częstości rezonansowej o około 7 ppm. Różnice te są również doskonale widoczne w widmach FT-IR, w których dla form jonowych obserwowane jest przesunięcie się pasma rozciągającego  $\nu(\text{C}=\text{O})$  dla grupy karbonylowej C(11)=O w kierunku niższych częstości, które nakłada się z drganiem rozciągającym od grupy C(8)=O (Fig. 3 w

pracy **H2**). Widoczne jest również charakterystyczne pasmo od drgań deformacyjnych  $\delta(\text{N}^+-\text{H})$  przy około  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Wykazano zatem, że postać widm **Rif** rejestrowanych w ciele stałym jest zależna od sposobu oczyszczania tego antybiotyku (sposobu krystalizacji, który jest niezwykle istotny ze względu na kontrolowanie procesu syntezy tego leku oraz sprawdzanie jego czystości). Warto w tym miejscu podkreślić na różnice w położeniu pasm absorpcji w widmach FT-IR, jak i sygnałów w widmach NMR dla obu form **Rif**. Różnice, o których mowa są na tyle duże, że w przypadku **Rif** jak i innych antybiotyków z tej grupy związków, należy zwracać szczególną uwagę na możliwość występowania tych związków w wielu formach strukturalnych. Pominięcie tego faktu może skutkować błędną analizą, na przykład preparatu zawierającego ten związek, lub odrzuceniem jakiejś porcji antybiotyku ze względu na różnice spektroskopowe w ciele stałym. Doskonałym przykładem jest nasza obserwacja, pokazująca że dla **Rif** zakupionej z jednego źródła ale z różnych serii opakowań odnotowaliśmy odmienne obrazy spektroskopowe w ciele stałym. W jednych opakowaniach znajdowała się **Rif** w formie niejonowej, natomiast w innym opakowaniu była zawarta mieszanina formy jonowej i niejonowej **Rif** sugerujące „zanieczyszczenie” (Rysunek 4).

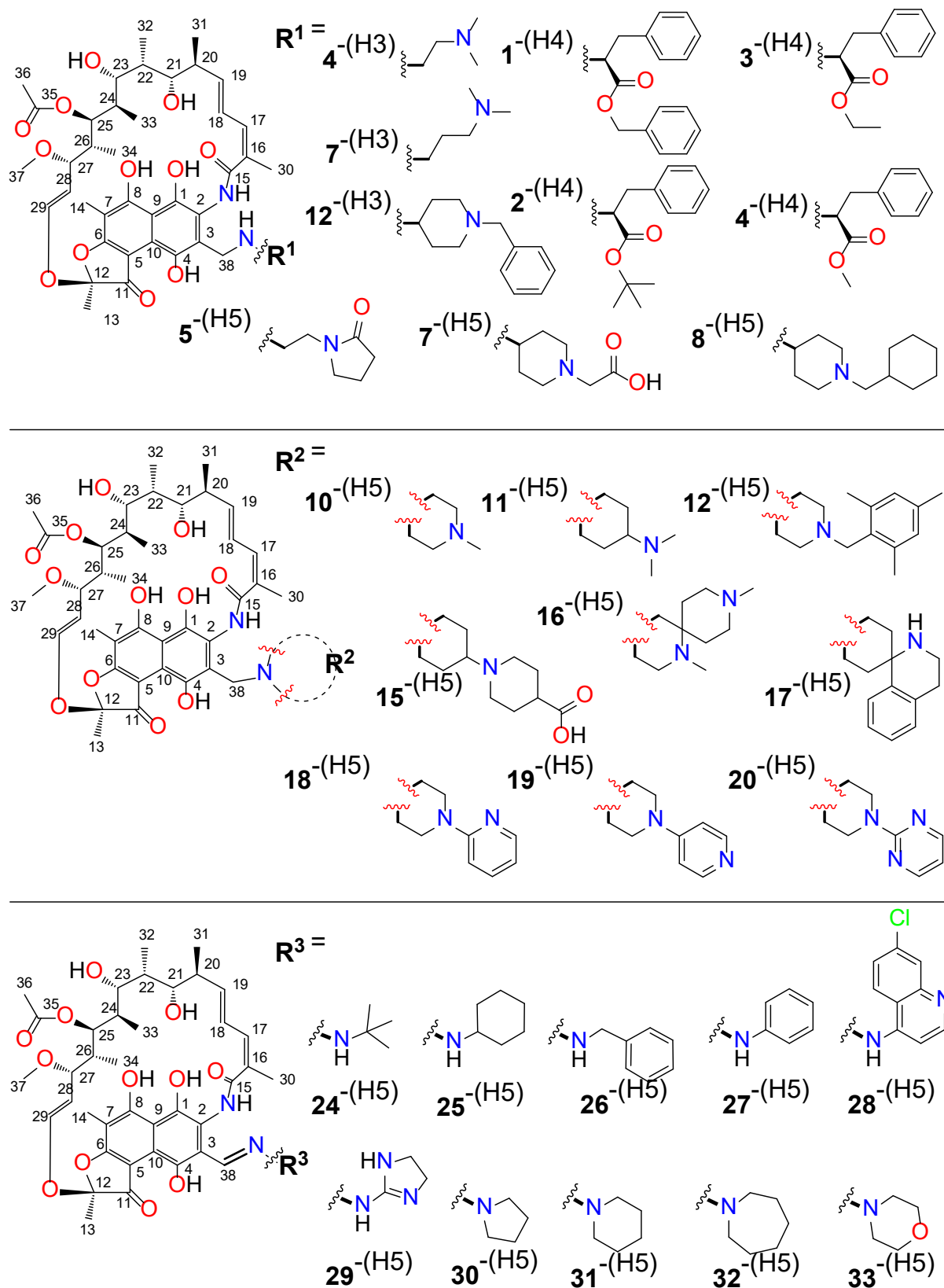


Rysunek 4 Fragment widma  $^{13}\text{C}$  NMR w ciele stałym,  $^{15}\text{N}$  NMR w ciele stałym oraz widmo FTIR zarejestrowane w pastylkach KBr w zakresie  $1400 - 1800\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.2.2 Omówienie prac H3, H4 i H5

Aktywność biologiczna **Rif** związana jest z unikalną strukturą tej cząsteczki, jak było wspomniane na wstępie, bardzo istotną rolę w oddziaływaniu tej klasy antybiotyków z bakteryjnymi polimerazami RNA odgrywa konformacja mostu ansamycynowego. Jednakże chociaż samo dopasowanie mostu ansamycynowego jest warunkiem koniecznym, to nie jest warunkiem dostatecznym, występowania wysokiej aktywności mikrobiologicznej rifamycyn. Równie istotną rolę pełni w tym przypadku podstawnik w pozycji C(3), co doskonale pokazuje przypadek **Ral**, dla którego odnotowuje się zdecydowanie niższe wartości MIC w testach aktywności przeciwbakteryjnej. W pracach **H3**, **H4** i **H5** zostały zaprezentowane nowe aminowe pochodne **Ral** zawierające różne grupy funkcyjne, takie jak: trzeciorzędowe aminy, podstawione układy triazolowe, pochodne aminokwasów oraz nowe hydrazony. Na podstawie uzyskanych wyników spektroskopowych i badań biologicznych została również zaprezentowana dyskusja zależności struktura–aktywności dla tych związków. Nie chcąc wprowadzać niepotrzebnego zamieszania z dodawaniem innej numeracji niż w materiałach źródłowych, pozostawię oznaczenia pochodnych w zgodzie z tymi zawartymi w pracach **H3** – **H5** dodając za każdym razem przy korzystaniu z oznaczenia danego związku informacji, z której pracy pochodzi ten związek podając w nawiasie oznaczenie publikacji [np. **1**-(H3)].

Z wcześniejszych prac naukowych wiadomo, że za wysoką aktywność **Rif** odpowiada możliwość protonacji atomu azotu N(43), która jest realizowana w formie jonowej w rozpuszczalnikach protycznych (możliwość oddziaływania z ujemnie naładowanym wysoce konserwatywnym glutaminianem E<sub>445</sub>).<sup>4,5</sup> W celu sprawdzenia wpływu podstawnika w pozycji C(3) na strukturę i aktywność nowych aminowych analogów **Rif** została najpierw zsyntezowana seria pochodnych zawierająca zasadowe podstawniki na linkerach etylowych lub propylowych **4**-(H3)–**11**-(H3), **13**-(H3) i **14**-(H3) oraz ugrupowanie piperidynowe z podstawionym grupą benzyłową atomem azotu **12**-(H3) (Rysunek 5, Fig.4 w pracy **H3**) [**H3**]. W pracy **H4** otrzymane zostały pochodne estrowe różnych aminokwasów **1**-(H4)–**12**-(H4) (Rysunek 5, Scheme 2 w pracy **H4**). Z kolei w pracy **H5** zaprezentowanych zostało kilka serii aminowych pochodnych **Ral** zawierających w swojej strukturze zasadowe układy heterocykliczne w tym także zróżnicowane układy amidowe **2**-(H5)–**23**-(H5) (Rysunek 5, Scheme 1a w pracy **H5**) oraz 10 pochodnych będących hydrazonami **Ral** **24**-(H5)–**33**-(H5) (Rysunek 5, Scheme 1b w pracy **H5**). Na podstawie analizy spektroskopowej tych pochodnych okazało się, że niemal wszystkie aminowe analogi **Rif** występują w formie



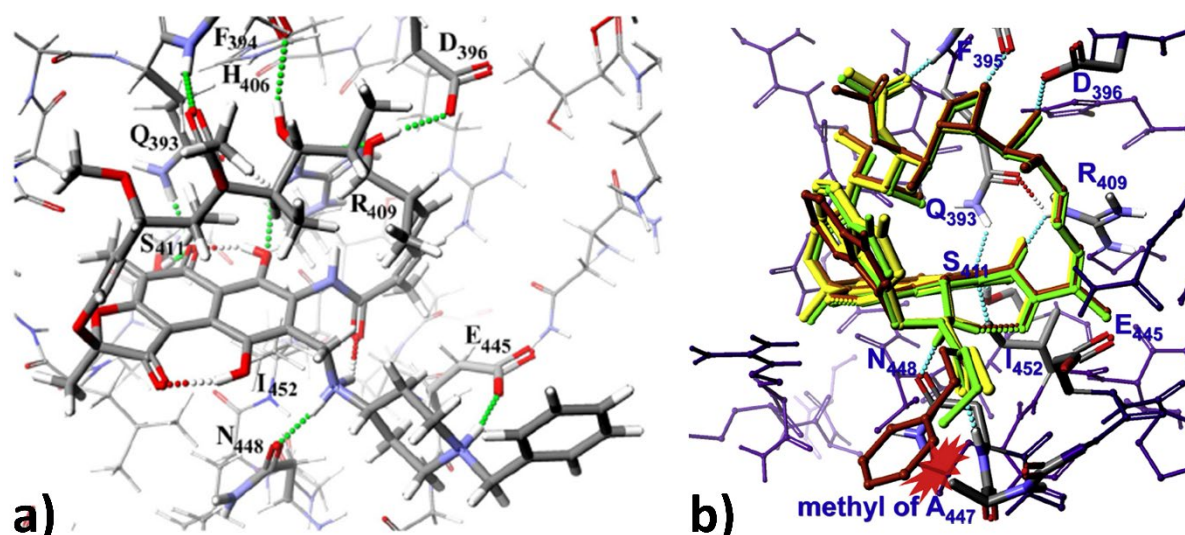
Rysunek 5 Struktury wybranych aminowych analogów Rif i pochodnych hydrazonowych Ral z prac H3-H5.

zwitterjonowej, a proton z grupy fenolowej O(8)H był przenoszony na atom azotu N(38), o czym świadczyły charakterystyczne pozycje dla sygnałów od protonu/ów N<sup>+</sup>(38)-H i atomów węgla C(8) i C(11) w widmach <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Jedynie dla pochodnych **10**-(H4)–**12**-(H4) zaobserwowane zostały struktury jonowe, w których proton przenoszony był na centrum zasadowe wprowadzonego podstawnika (Scheme 2 w pracy **H4**). Fakt ten był niekorzystny z punktu widzenia potencjalnego dopasowania molekularnego, takiego jak w przypadku **Rif** z RNAP (oddziaływanie z E<sub>445</sub>). Poza miejscem protonacji, kolejnym czynnikiem mogącym wpływać niekorzystnie na aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych były parametry fizykochemiczne, takie jak rozpuszczalność w wodzie i wartości logP, które przyjmują lepsze wartości dla **Rif** w porównaniu z badanymi pochodnymi (Table 4 w pracy **H3**, Table 1 w pracy **H4**, Table 9S w suplemencie do pracy **H5**). Czynnikiem strukturalnym, który miał niekorzystny wpływ na wyniki badań mikrobiologicznych było też tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, w które zaangażowane były atomy azotów w podstawniku przyłączonym do atomu węgla C(3). Oddziaływania te utrudniała wiązanie z polimerazami RNAP, co dotyczyło przede wszystkim pochodnych otrzymanych w pracach **H3** i **H4** (Fig. 6 w pracy **H3** i Fig. 2a i b w pracy **H4**). Między innymi te fakty spowodowały, że związki tego typu, w przeważającej większości, nie wykazały spektakularnej aktywności mikrobiologicznej w porównaniu do **Rif**, przy czym należy zauważyć, że pochodne **4**-(H3) – **11**-(H3) z reguły wykazywały wyższą aktywność od substancji startowej **Ral** (Tabela 3, Table 3 w pracy **H3**,). Wyjątkiem w tej serii pochodnych był związek **12**-(H3), który w przypadku bakterii Gram-dodatnich wykazywał aktywność MIC = 0,25 µg/ml, natomiast po dodatkowej protonacji wartości MIC zmalały o jeden rząd wielkości dla szczepów bakterii *S. epidermidis*. Pochodna **12**-(H3) oraz jej sól wykazały identyczną aktywność przeciwdrobnoustrojową co **Rif** w przypadku prątków gruźlicy (MIC = 0,005 µg/ml), a wartości MIC w przypadku szczepu *M. Bovis* były nieco lepsze (MIC = 0,125 µg/ml). Wysoka aktywność protonowanego związku **12+H**-(H3) wynika z analogicznego sposobu oddziaływania tego związku z bakteryjną polimerazą RNA jak **Rif** z jednoczesną realizacją przez ten związek kluczowego oddziaływania z glutaminianem E<sub>445</sub>, co doskonale wizualizuje model teoretyczny na podstawie dokowania molekularnego (Rysunek 6a, Fig. 13a w pracy **H3**). W tym miejscu nasuwa się jednak pytanie, jaki czynnik jest odpowiedzialny za bardzo interesującą aktywność przeciwbakteryjną pochodnych estrowych aminokwasów niezawierających w swojej strukturze ugrupowań zasadowych. W przypadku tych pochodnych, które są aminowymi

Tabela 3 Wybrane wyniki testów aktywności przeciwbakteryjnej **Rif**, **Ral** i wybranych pochodnych **Ral**. Wartości MIC podane są w µg/ml. Dla **Rif** i **Ral** w indeksie górnym podano publikację, z której wzięto wartość MIC.

Związek	Szczep bakterii					
	<i>S. aureus</i> ATCC 4163	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> ATCC 49134	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i>
<b>Ral</b>	2 <sup>H4</sup>	4 <sup>H5</sup>	4 <sup>H5</sup>	2 <sup>H5</sup>	>1 <sup>H3</sup>	>1 <sup>H3</sup>
<b>Rif</b>	0,008 <sup>H3</sup>	0,0156 <sup>H5</sup>	0,0156 <sup>H5</sup>	0,0156 <sup>H5</sup>	0,005 <sup>H3</sup>	0,25 <sup>H3</sup>
4-(H3)	1	1	0,5	0,5	1	1
12-(H3)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,005	0,125
12-(H3) + H <sup>+</sup>	0,125	0,125	0,06	0,03	0,005	0,125
20-(H3)	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
31-(H3)	1	>1	>1	>1	0,5	0,5
1-(H4)	0,5	0,5	0,125	0,25	-	-
2-(H4)	0,5	0,5	0,125	0,25	-	-
3-(H4)	0,063	0,063	0,063	0,063	-	-
4-(H4)	0,063	0,063	0,031	0,031	-	-
6-(H4)	0,5	0,25	0,063	0,063	-	-
7-(H4)	0,031	0,031	0,016	0,016	-	-
5-(H5)	-	2	2	1	-	-
7-(H5)	-	0,25	0,0625	0,0625	-	-
11-(H5)	-	0,25	0,125	0,125	-	-
15-(H5)	-	0,0078	0,0078	0,0078	-	-
16-(H5)	-	0,25	0,0625	0,0625	-	-
29-(H5)	-	0,0078	0,0078	0,0078	-	-
30-(H5)	-	0,25	0,25	0,25	-	-
31-(H5)	-	0,0156	0,0156	0,03125	-	-
32-(H5)	-	0,0625	0,03125	0,03125	-	-



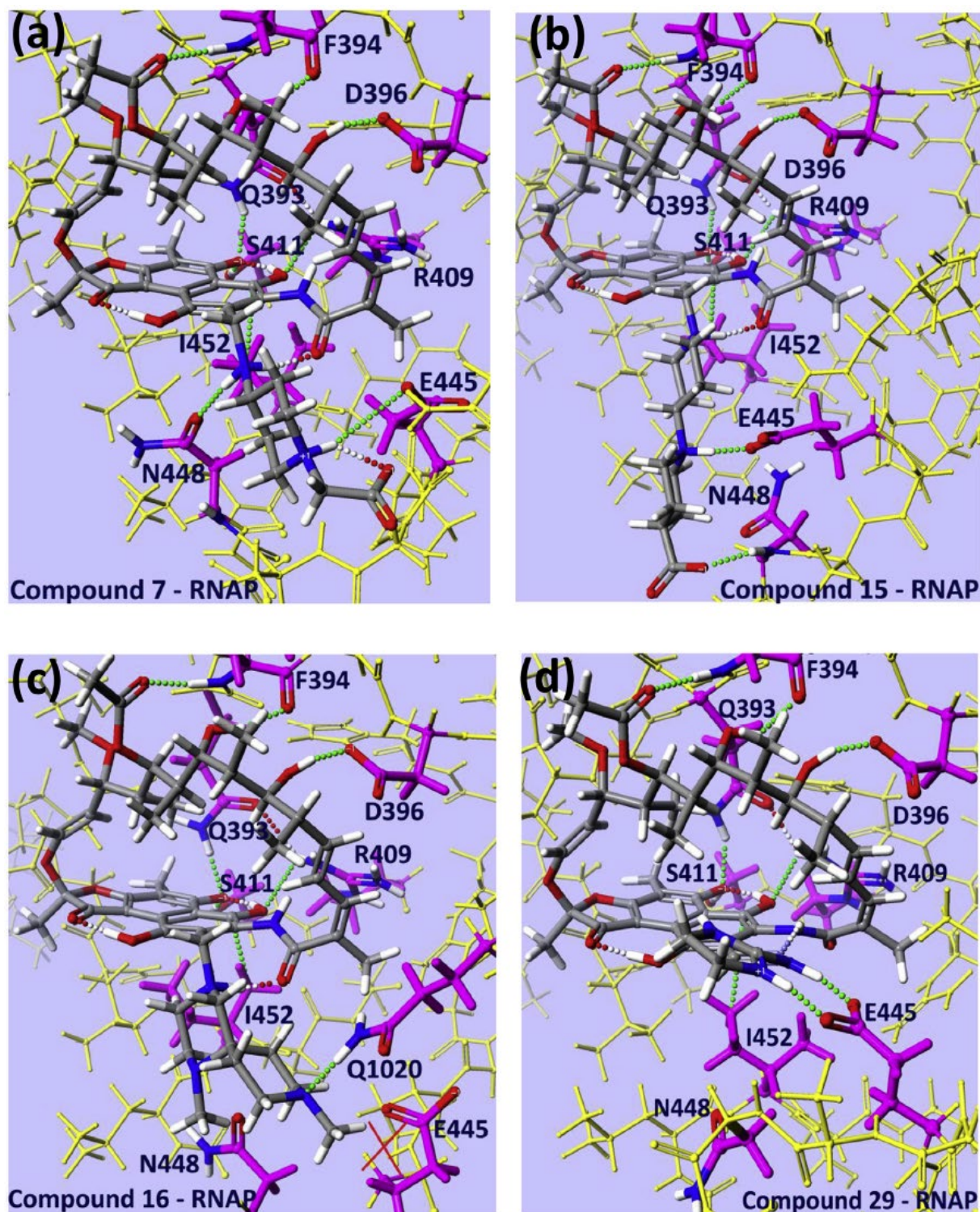


Rysunek 6 a) najkorzystniejsze energetycznie oddziaływania międzykaszczekowe między kluczowymi aminokwasami RNAP i 12+H<sup>+</sup>-(H3)<sup>H3</sup>; b) model oddziaływania nowych pochodnych rifamycyn 5-(H4) – kolor brązowy, 6-(H4) – kolor zielony, 7-(H4) – kolor żółty w miejscu wiążącym z polimerazą RNA zależną od DNA *Thermus aquaticus* (RNAP-fiolet)<sup>H4</sup>

analogami **Rif** z estryfikowanymi aminokwasami Phe, Trp i Tyr widoczna była zależność związana z wielkością podstawnika estrowego. Mniejsze podstawniki (Me, Et) przyczyniły się do uzyskania przez te związki mniejszych wartości MIC tj. większej aktywności, które w wielu przypadkach były tylko o jeden rząd wielkości większe od **Rif** (Tabela 3, Table 1 w pracy **H4**). W przypadku tych pochodnych ich model oddziaływania z RNAP w miejscu allosterycznym jest bardzo podobny do tego realizowanego dla innych rifamycyn. Kluczową różnicą jest możliwość utworzenia międzykaszczekowego wiązania wodorowego między karbonylową grupą estrową aminowego podstawnika w pozycji C(3) a peptydową grupą NH alaniny A<sub>447</sub> (Rysunek 6b, Fig. 3 w pracy **H4**). To dodatkowe oddziaływanie stabilizujące aminokwasowe pochodne generuje zawadę steryczną między podstawnikiem estrowym i grupą metylową A<sub>447</sub>. Biorąc pod uwagę ten rezultat dokowania molekularnego uzasadniona wydawała się zależność SAR – dlatego preferowane są mniejsze podstawniki w strukturze tego typu pochodnych w kontekście wyższej aktywności mikrobiologicznej.

W przypadku wszystkich aminowych analogów **Rif** występują one w postaci formy zwitterjonowej a protonacji w zdecydowanej większości ulega atom azotu N(38) z utworzeniem fenolanu w pozycji O(8). W przypadku pochodnych uzyskanych w pracy **H5**, na szczególną uwagę zasługują dwie pochodne 7-(H5) i 15-(H5) (Rysunek 5). Związki te mają jedną wspólną cechę, którą jest obecność w ich strukturze grupy karboksylowej przy sztywnym podstawniku, która ze względu na swój kwasowy charakter wpływa na strukturę tych pochodnych – są to „podwójne” zwitterjony. Protonacji oprócz atomu azotu N(38)





Rysunek 7 Modele dokowań dla nowych pochodnych rifamycyn (kolor szary): a) 7-(H5), b) 15-(H5), c) 16-(H5), d) 29-(H5) w miejscu wiązania z RNAP *T. aquaticus*<sup>19, H5</sup>

ulegają również wprowadzone centra zasadowe w podstawnikach. Taka podwójnie zwitterjonowa struktura wpływa na bardzo duży skok aktywności przeciwbakteryjnej względem innych pochodnych **Ral** (Tabela 3, Table 2 w pracy **H5**), która jest wynikiem

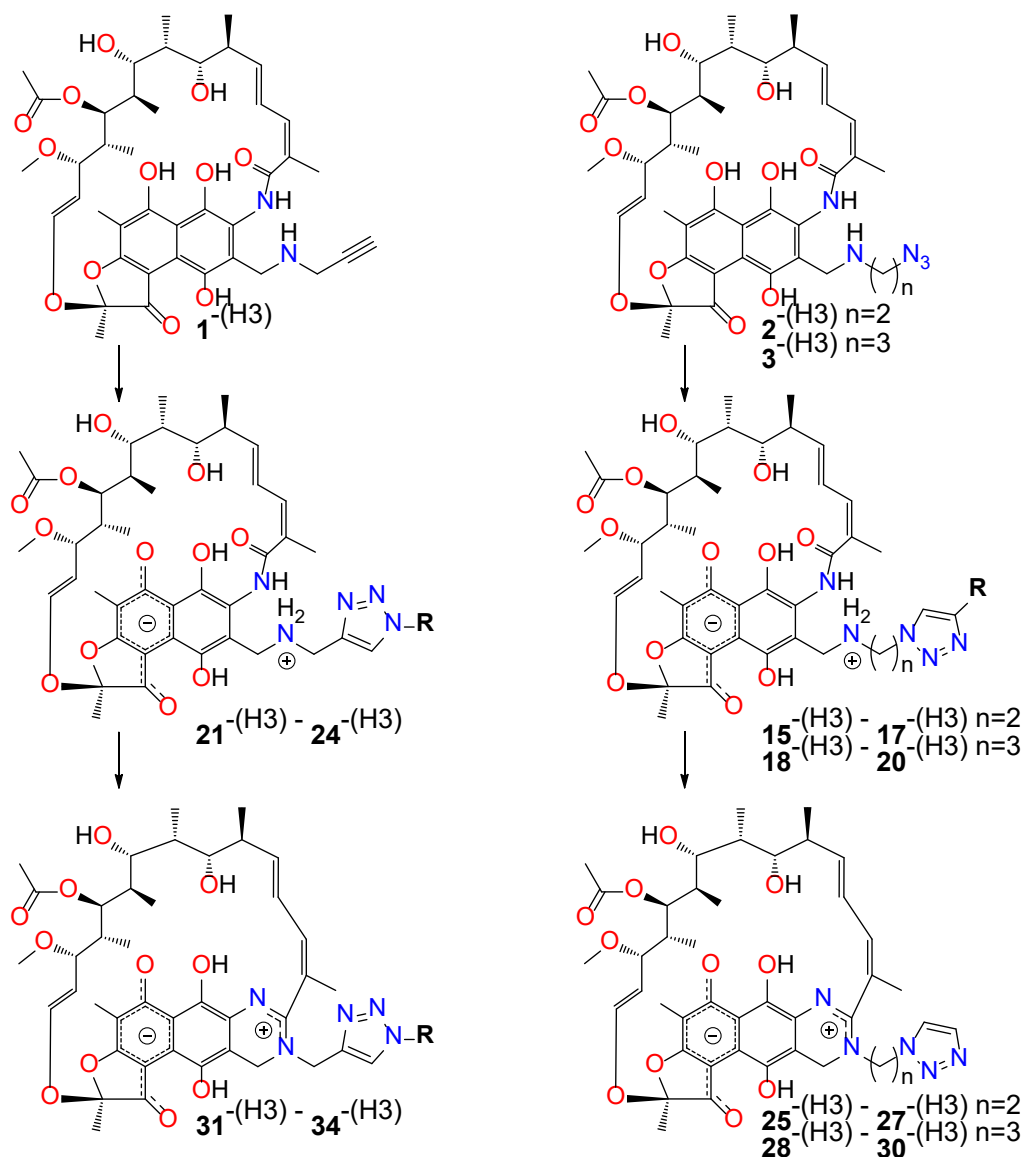
doskonałego dopasowania molekularnego inhibitorów bakteryjnej polimerazy RNA. W obu przypadkach może być realizowane wiązanie stabilizujące z E<sub>445</sub> (RNAP), a w przypadku pochodnej **15**-(H5) obecność grupy karboksylanowej umożliwia utworzenie dodatkowego oddziaływania wodorowego z grupą NH łańcucha bocznego asparaginy N<sub>448</sub> (Rysunek 7a i b, Fig.3a i b w pracy **H5**). Porównując wartości MIC dla **15**-(H5) wyraźnie można było zauważyć, że zdecydowana poprawa rozpuszczalności kosztem lipofilowości i poprawienie stabilizacji antybiotyku w miejscu wiązania z RNAP skutkuje wzrostem aktywności przeciwbakteryjnej (MIC = 0,0078 µg/ml), nawet w porównaniu do wyników uzyskanych dla **Rif**. W przypadku pochodnej **7**-(H5) obiecujące wyniki uzyskano dla szczepów *S. epidemidis* (MIC = 0,0625 µg/ml) – podobne wyniki uzyskano dla pochodnej **16**-(H5), dla której teoretyczny model wiązania w miejscu wiążącym z RNAP ukazuje dodatkową stabilizację poprzez oddziaływanie wodorowe z glutaminą Q<sub>1020</sub> (Rysunek 7c, Fig. 3c w pracy **H5**).

Spośród otrzymanych hydrazonów **Ral** (Rysunek 5, Scheme 1 w pracy **H5**) dwa z nich występowały w roztworze w formie jonowej **28**-(H5) i **29**-(H5), a miało to związek z tym, że tylko te pochodne zawierały w swojej strukturze zasadowe ugrupowanie zdolne do protonacji. Najciekawsze spostrzeżenia dostarczyła analiza wyników aktywności przeciwbakteryjnej, ponieważ spośród z przebadanych hydrazonów **24**-(H5)–**33**-(H5) wyróżniającymi były tylko 3 związki (

Tabela 3, Table 2 w pracy **H5**). Dwa z nich, będące izostrukuralne z **Rif** i zawierają cykliczne układy: piperydynowy **31**-(H5) i azepanowy **32**-(H5), charakteryzowały one aktywnością porównywalną z tą uzyskaną dla rifaksyminy (**Rifx**) i tylko nieco słabszą od **Rif**. Z kolei związek **29**-(H5) swoją aktywnością dorównywał związkowi **15**-(H5), co tłumaczone było jego dobrze zbilansowanymi właściwościami fizykochemicznymi (rozpuszczalność w wodzie 4,25 mg/ml i logP = 1,33) oraz korzystnym modelem wiązania z RNAP, w którym udział bierze wysoce konserwatywny glutaminian E<sub>445</sub> (Rysunek 7d, Fig. 3 w pracy **H5**).

Z punktu widzenia chemika organika ciekawym było sprawdzenie stabilności aminowych analogów **Rif** w sytuacji, gdy związki te będą stanowiły platformę do dalszej rozbudowy. W publikacji **H3** została otrzymana seria triazolowych pochodnych **15**-(H3)–**24**-(H3) (Schemat 6, Fig 1 w pracy **H3** i Fig 3 w pracy **H3**), którą zsyntezowano wykorzystując odpowiednio sfunkcjonalizowane aminowe analogami **Rif** posiadające ugrupowania azydkowe lub alkinowe. Metoda syntetyczna została dobrana na podstawie testów reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (CuAAC), w których użyte zostały różne ekwiwalenty

katalizatora (CuOAc) w zakresie temperatur 0° – 60°C. Uzyskane wyniki ukazały, że najlepsze rezultaty (% konwersji substratu i czas reakcji) udało się osiągnąć stosując 10% katalizatora i temperaturę 60°C (Table 2 w pracy **H3**). Dla lotnych reagentów alkinowych, które były użyte do syntezy pochodnych **15-(H3)–20-(H3)** najlepszym rozwiązaniem było obniżenie temperatury do 22°C i wydłużenie czasu reakcji. Jednak zbyt długa ekspozycja aminowych analogów **Rif** na działanie środowiska reakcji w czasie prowadziła nieoczekiwanie do uzyskania nowych heterocyklicznych pochodnych zawierających układ 3,4-dihydrobenzo[g]chinazolinowy **25-(H3)–34-(H3)** (Schemat 6, Fig 1 w pracy **H3** i Fig 3 w pracy **H3**). Wyniki aktywności przeciwbakteryjnej dla wszystkich pochodnych zawierających triazolowe ugrupowanie **15-(H3)–34-(H3)** nie były jednak bardzo atrakcyjne w porównaniu z **Rif** (Table 3 w pracy **H3**).

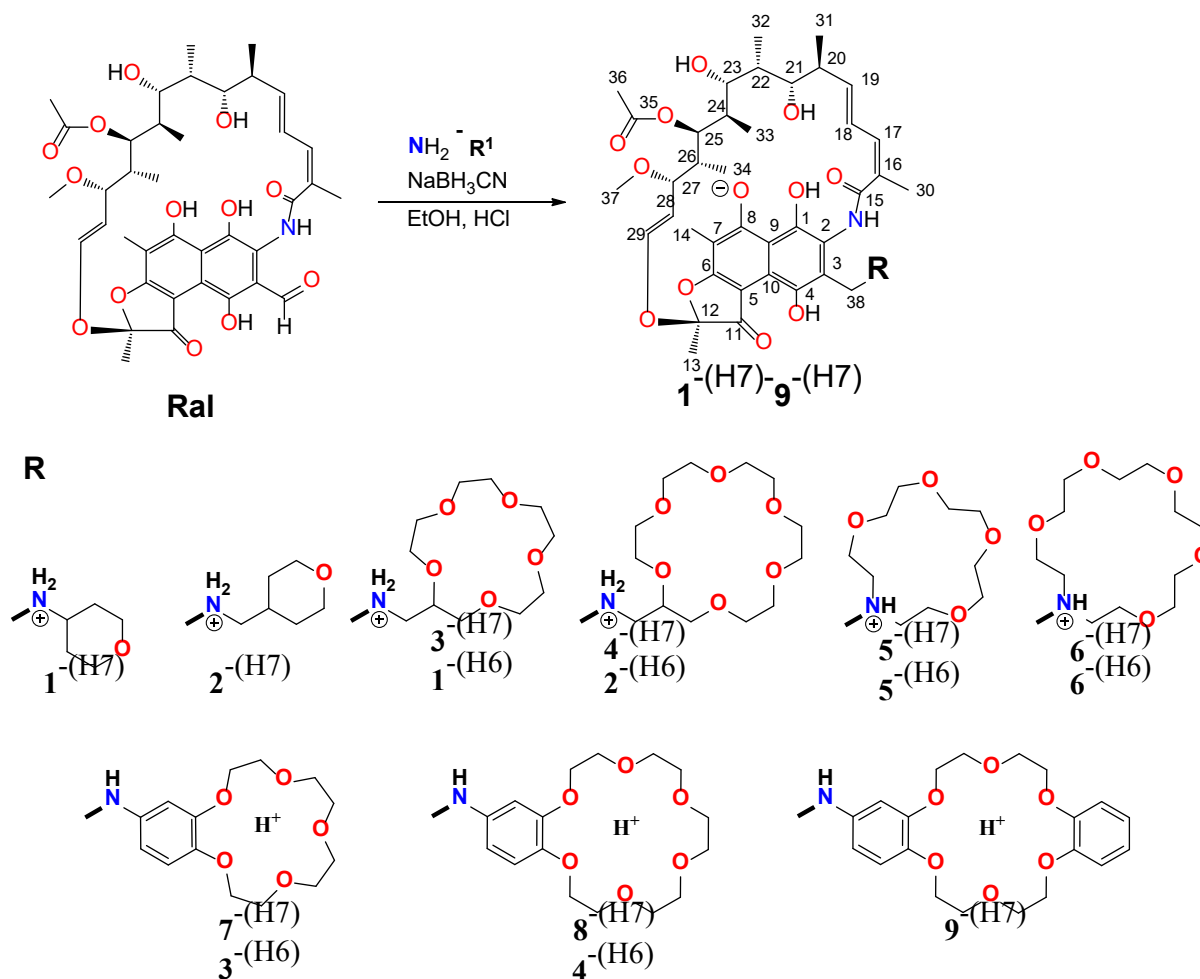


Schemat 6 Schemat syntezy triazololowych pochodnych aminowych analogów Rif 15-H(3) – 24-(H3) i ich heterocyklicznych pochodnych 25-H(3) – 34-(H3).

#### 4.3.2.3 Omówienie prac H6 i H7

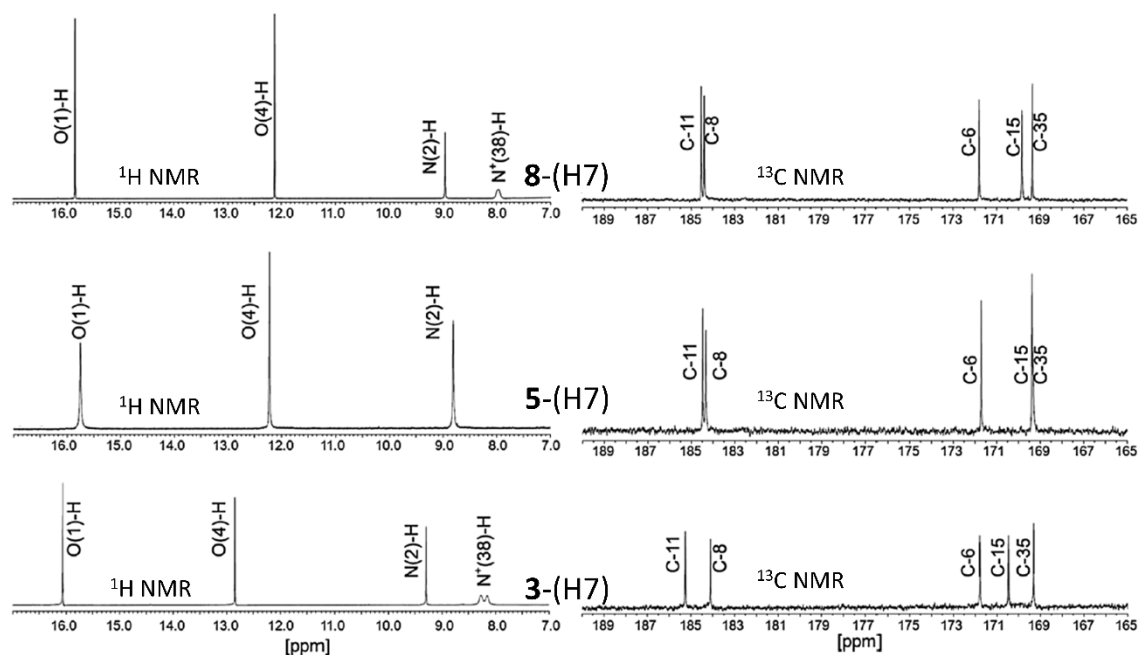
Uzupełnieniem badań SAR, dla roli podstawnika w pozycji C(3) aminowych analogów Rif było otrzymanie pochodnych zawierających w swojej strukturze etery koronowe (Schemat 7, Fig. 1 w pracy H6 i Fig. 1 w pracy H7). W przypadku eterów aminometylokoronowych 3-(H7) i 4-(H7) oraz układów azakoronowych 5-(H7) i 6-(H7) obraz spektroskopowy nie odbiegały od tego obserwowanego dla pozostałych aminowych pochodnych Ral 1-(H7) i 2-(H7), a zatem występowały one w formie jonowej z protonowanym atomem azotu N(38) (Rysunek 8, Fig. 2 w pracy H6 i Fig. 2a w pracy H7).

Pochodne 7-(H7)–9-(H7), różniły się tym, że do ich otrzymania użyto 4<sup>-</sup>-aminobenzokorony. Zastosowanie takiego układu aminobenzokoronowego wiązało się ze zmniejszoną zasadowością atomu azotu w kontekście analizowanego procesu przenoszenia protonu z grupy fenolowej O(8)-H. Potwierdzeniem tego założenia był brak odpowiedniego sygnału w

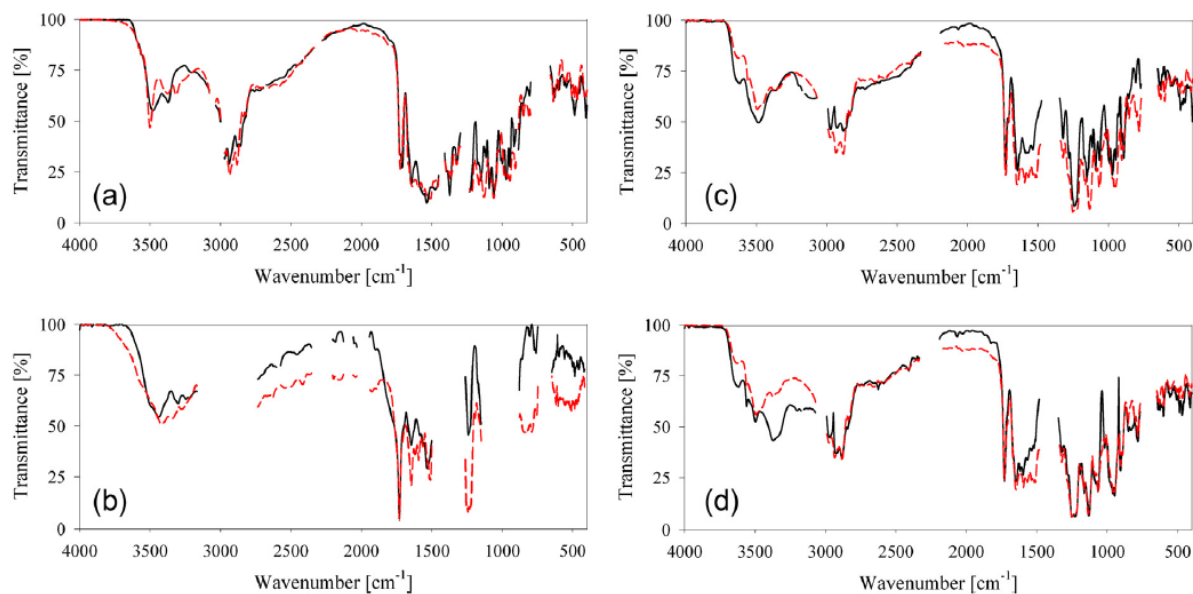


*Schemat 7* Metoda syntezy i struktura nowych pochodnych aminowych pochodnych **Ral** zawierających w swojej strukturze układy koronowe. W przypadku pochodnych, które zostały pokazane w pracy **H6** zastosowano dodatkową notację pod numeracją wykorzystaną w pracy **H7**.





Rysunek 8 Porównanie fragmentów widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR dla wybranych pochodnych z prac **H6** i **H7**.

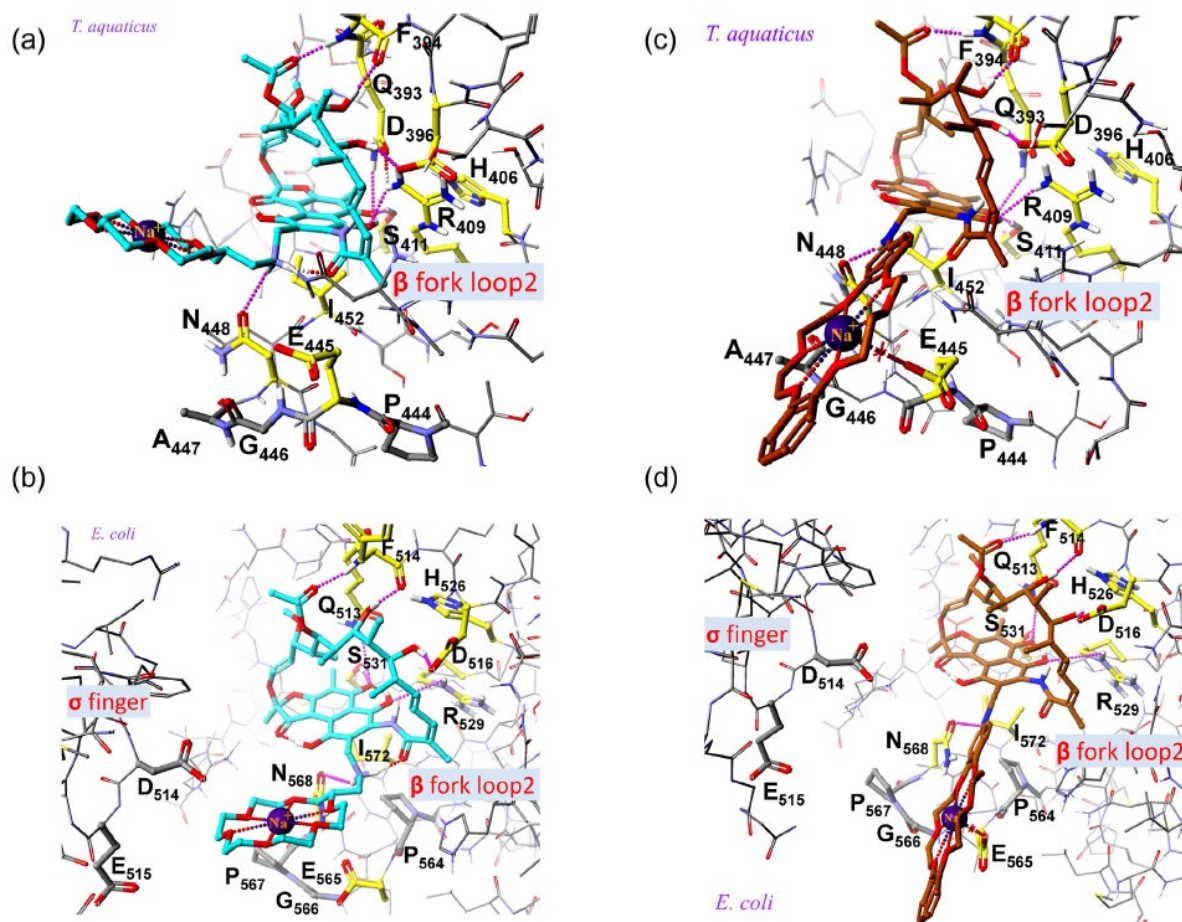


Rysunek 9 Porównanie widm FT-IR: (a) **1**-(H7) (linia czarna) i **9**-(H7) (linia czerwona przerywana) w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (b) **1**-(H7) (linia czarna) i **9**-(H7) (linia czerwona przerywana) w DMSO; (c) **1**-(H7) (linia czarna) i **9**-(H7) (linia czerwona przerywana) w ACN; **9+histamina**-(H7) (linia czarna) i **9**-(H7) (linia czerwona przerywana) w ACN.

ich widmach  $^1\text{H}$  NMR od protonu  $\text{N}^+(38)\text{H}$  (Rysunek 8, Fig. 1 w pracy **H6** i Fig. 1 w pracy **H7**). Jednakże dane zebrane z widm  $^{13}\text{C}$  NMR wskazywały, że grupa fenolowa O(8)-H jest deprotonowana, ale w widmach protonowych brak było sygnału potwierdzającego jego lokalizację. Rozwiązanie tej łamigłówki było możliwe dzięki zastosowaniu pomiarów FT-IR z dodatkiem cząsteczek wody (Rysunek 9, Fig. 3 i 5 w pracy **H6** i Fig. 3 w pracy **H7**). W widmach tych pojawiają się kontinua absorpcji, które świadczą o obecności w strukturach **7**-(H7)–**9**-(H7) kationów  $\text{H}_3\text{O}^+$  lub kationów Zundela  $\text{H}_5\text{O}_2^+$ .<sup>29,30</sup> Zatem transfer protonu O(8)H

był realizowany do wnętrza eteru benzokoronowego dla omawianych pochodnych (Schemat 7, Fig. 1 w pracy **H6** i Fig. 1 w pracy **H7**).

Dla pochodnych **1-(H7)–9-(H7)** zostały wykonane testy aktywności przeciwbakteryjnej (Table 2 w pracy **H7**), do których włączone zostały kompleksy z litem lub potasem dla pochodnych **3-(H7)** i **4-(H7)** oraz kompleksy układów benzokoronowych **7-(H7)–9-(H7)** z wybranymi aminami. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że przekształcenie związków ze zwykłymi układami aminometylokoronowymi **3-(H7)** i **4-(H7)** w ich kompleksy z kationami  $\text{Li}^+$  i  $\text{Na}^+$  zwiększa lub zachowuje wartości MIC (Table 2 w pracy **H7**). Sytuacja była jednak dla pochodnych **7-(H7)–9-(H7)**, dla których największy zysk we wzroście aktywności przeciwbakteryjnej został zaobserwowany dla kompleksów z histaminą – zmniejszenie wartości MIC nawet 8-krotne (Table 2 w pracy **H7**). Kompleksy **7-(H7)–9-(H7)** z 2ClBzA i 4FbzA okazały się tylko nieco słabsze od tych z histaminą w stosunku do przebadanych szczepów bakterii Gram-dodatnich. Natomiast najmniejszy skok aktywności w stosunku do wyjściowych pochodnych zanotowano dla kompleksów z izoniazidem, co najprawdopodobniej miało związek z najmniejszą stabilnością kompleksów związków **7-(H7)–9-(H7)** z badanymi aminami. Wyniki modelowania molekularnego otrzymanych pochodnych wskazały, że w przypadku eterów benzokoronowych obecność w układzie koronowym dodatnio naładowanego indywiduum molekularnego (np. kationu metalu) może dodatkowo stabilizować tego typu związki w miejscu wiązania z RNAP (Rysunek 10, Fig. 4 w pracy **H7**).



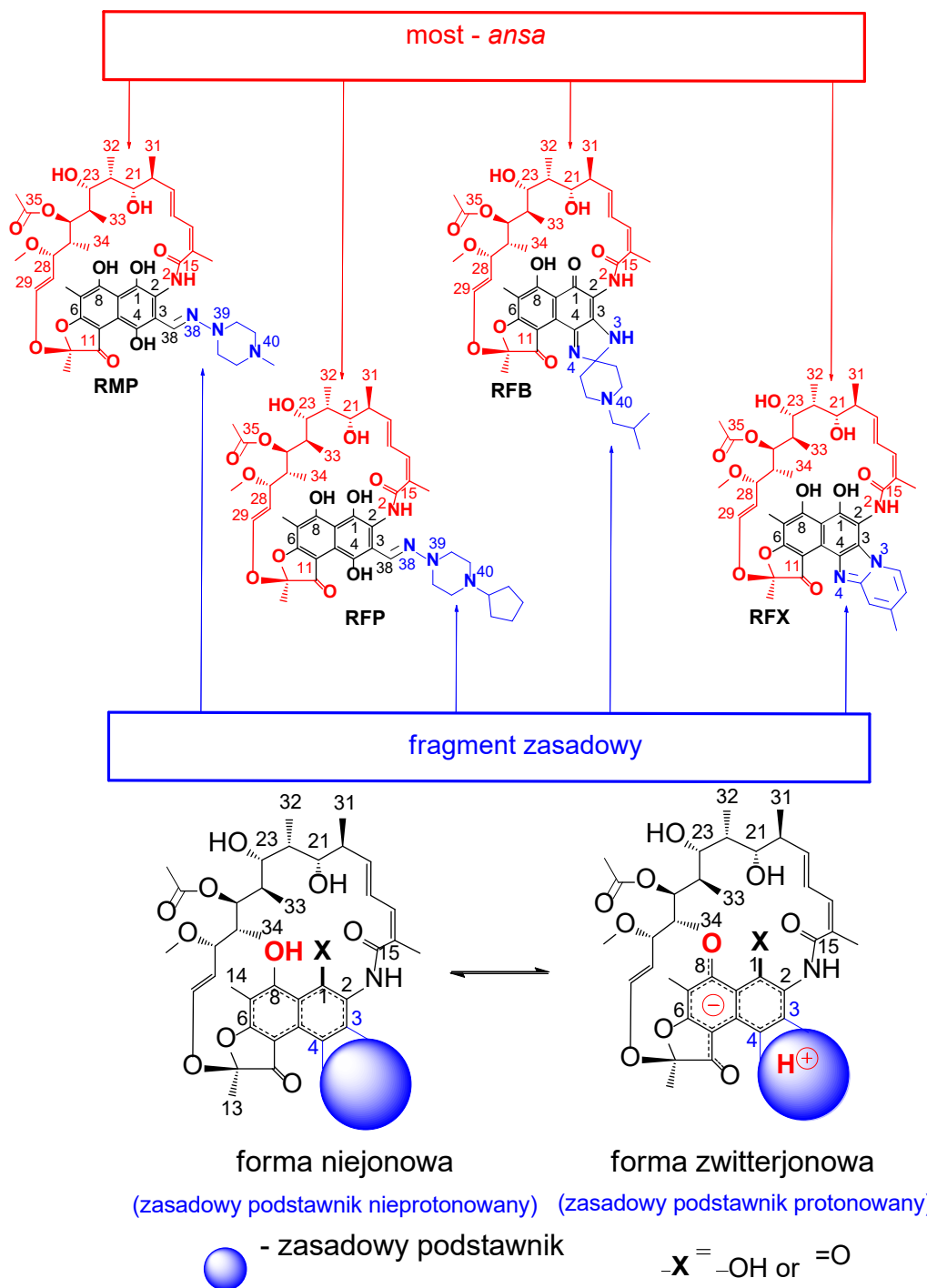
Rysunek 10 Model dokowania nowych pochodnych rifamycyn: 4- $\text{Na}^+$ -(H7) (a i b) i 9- $\text{Na}^+$ -(H7) (c i d) w miejscu wiązania bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA *T. aquaticus* i *E. coli*.<sup>17</sup>

#### 4.3.2.4 Omówienie pracy H8

Rifamycyny, jako antybiotyki, charakteryzują się bardzo szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej szczególnie w przypadku bakterii G<sup>+</sup> i Mycobakterii.<sup>17,23</sup> W przypadku bakterii G<sup>-</sup> sytuacja jest jednak nieco bardziej zróżnicowana. **RMP** i rifapentyna (**RFP**) nie wykazują tak wysokiej aktywności w stosunku do bakterii G<sup>-</sup> jak np. ryfabutyna (**RFB**) czy ryfaksymina (**RFX**) (Rysunek 11, Fig. 1 w pracy **H8**).<sup>17</sup> W literaturze można było znaleźć informacje, że różnica ta może mieć związek ze zdolnością **RFB** i **RFX** do łatwiejszej penetracji przez ścianę komórkową bakterii i system błon komórkowych bakterii G<sup>-</sup>.<sup>23,31</sup> Należało oczywiście oczekiwać, że taka różnica będzie miała związek z różnicami w budowie ścian i błon komórkowych bakterii G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup>.<sup>32,33</sup> Bakteryjne polimerazy RNA niezależnie od tego, czy pochodzą od bakterii G<sup>+</sup> czy G<sup>-</sup> mają bardzo podobną budowę i w ten sam sposób wiążą się z antybiotykami z grupy rifamycyn. Fakt ten tylko jeszcze bardziej sugerował, że jedną z przyczyn w obserwowanej różnicy aktywności między tymi antybiotykami może być



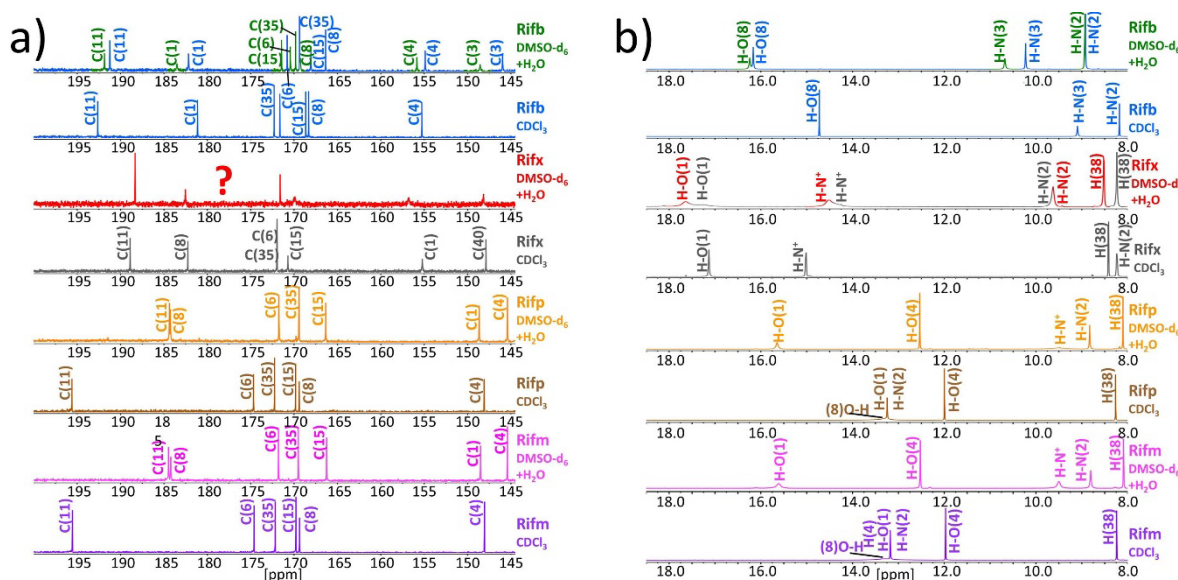
sposób dotarcia do wnętrza poszczególnych komórek bakteryjnych. W pracy **H8** po raz pierwszy została eksperymentalnie udowodniona dynamiczna równowaga konformacyjna mostu ansamycynowego w roztworze dla **RFB** i **RFX**, w przeciwieństwie do **RMP** i **RFP**, ułatwia zrozumienie większego spektrum aktywności przeciwbakteryjnej dla **RFB** i **RFX** (zarówno G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup>) w porównaniu z **RMP** i **RFP** (tylko G<sup>+</sup>).



Rysunek 11 Struktury antybiotyków ansamycynowych w możliwych formach niejonowych i jonowych.<sup>H8</sup>

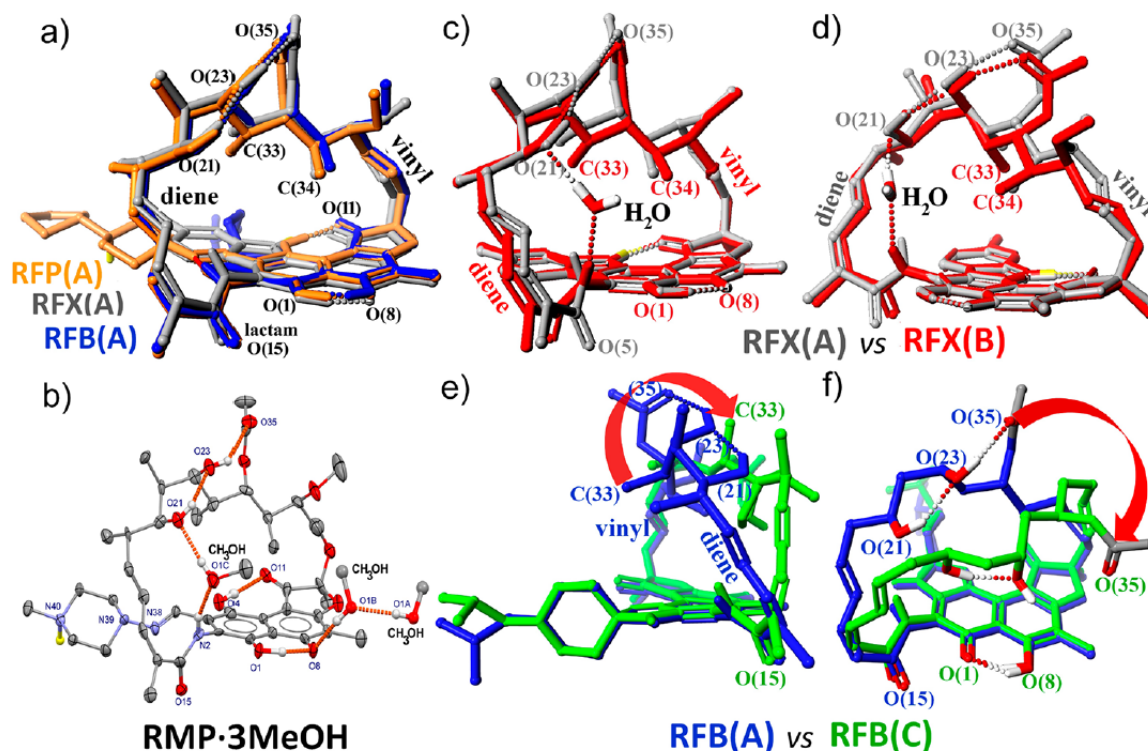
W widmach  $^{13}\text{C}$  NMR i  $^1\text{H}$  NMR zarejestrowanych w różnych  $\text{CDCl}_3$  lub  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  widoczne były zarówno podobieństwa, jak i różnice pomiędzy **RMP**, **RFP**, **RFB** i **RFX** (Rysunek 12, Fig. 2 w pracy **H8**). W przypadku widm zmierzonych w  $\text{CDCl}_3$  dla **RFP** i **RFB** widoczne były sygnały powyżej 190 ppm od atomu węgla C(11) i poniżej 170 ppm dla atomu węgla C(8) oraz sygnał od protonu grupy fenolowej O(8)H, analogiczna sytuacja miała miejsce dla **RMP**, zatem te trzy antybiotyki w aprotycznym rozpuszczalniku występują w formie niejonowej. W widmach NMR **RFB** zmierzonych w  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  można było zaobserwować podobne zależności jak w  $\text{CDCl}_3$ , zatem w przypadku tego antybiotyku nie dochodziło do wewnątrzcząsteczkowego przenoszenia protonu z grupy fenolowej O(8)H na podstawnik zasadowy w pozycji C(3)/C(4) i **RFB** niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika występowała w formie niejonowej. Odwrotnie jest w przypadku **RFX**, zarówno w układach protycznych i nieprotycznych w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR obecne były sygnały od atomów węgla C(11) i C(8) między 190 a 180 ppm i w widmie  $^1\text{H}$  NMR brak był odpowiedniego sygnału od grupy fenolowej O(8)H (Rysunek 12, Fig. 2 w pracy **H8**), a więc tak jak w przypadku **RMP** i **RFP** w formie jonowej. Dowodzi to, że cząsteczka **RFX** w roztworze występuje tylko i wyłącznie w formie jonowej z protonem zlokalizowanym na układzie amidynowym „spinającym” pozycje C(3) i C(4).

Kolejnym etapem było zbadanie konformacji mostu asnamycynowego dla **RMP**, **RFP**, **RFB** i **RFX** w zależności od polarności rozpuszczalnika. Dla **RMP** i **RFP** konformacja mostu



Rysunek 12 (a) Porównanie fragmentów widm  $^{13}\text{C}$  NMR dla **RMP**, **RFP**, **RFB** i **RFX** zarejestrowanych w  $\text{CDCl}_3$  lub  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  w temperaturze pokojowej; (b) Porównanie fragmentów widm  $^1\text{H}$  NMR dla **RMP**, **RFP**, **RFB** i **RFX** zarejestrowanych w  $\text{CDCl}_3$  lub  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  w temperaturze pokojowej; kolorem niebieskim oznaczono sygnały dla **RFB(A)**, zielonym – **RFB(C)**, szarym **RFX(A)**, czerwonym – **RFX(B)**<sup>H8</sup>

ansamycynowego była niemal identyczna i niezależna od rozpuszczalnika – z tego powodu struktura taka została sklasyfikowana jako konformer typu-A. Analiza widm **RFX** w różnych rozpuszczalnikach wykazała, że w  $\text{CDCl}_3$  związek ten również występuje w konformacji typu-A [**RFX(A)**] (Rysunek 13a, Fig. 4a w pracy **H8**). Z kolei widma tego antybiotyku w  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  były trudne do interpretacji i z tego powodu wykonano serie pomiarów w gradiencie temperatur włączając dodatkowy układ rozpuszczalników  $\text{CD}_3\text{CN}+\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 2 c i d w pracy **H8**). W pomiarach przy  $-30^\circ\text{C}$  w układach z  $\text{H}_2\text{O}$  okazało się, że **RFX** jest obecne w równowadze w postaci dwóch konformerów: **RFX(A)** i nowego typu konformera **RFX(B)**. Analiza porównawcza tych dwóch konformerów ukazała, że największe różnice są obserwowane dla układu dienowego, winylowego i grup metylowych C(33) i C(34). W tym momencie nasunęło się pytanie, co jest siłą napędową tworzenia struktury **RFX(B)**. Z pomocą przyszły pomiary FT-IR, które zostały wykonane w układach aprotycznych i w  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 3c w pracy **H8**). Najistotniejszą różnicą jest widoczne kontinuum absorpcji dla układu protycznego, które dowodzi, że za stabilizację tej formy odpowiada cząsteczka wody. Światło na to w jaki sposób cząsteczka wody stabilizuje konformer **RFX(B)** rzuciła nowo opracowana struktura krystalograficzna **RMP** z metanolem (Rysunek 13b, Fig. 4b w pracy **H8**). W strukturze tej występował kolektywny układ wiązań wodorowych, który łączył ze sobą grupę N(2)-H z grupą acetylową poprzez włączenie do układu grupy hydroksylowej O(21)H i cząsteczki metanolu. W celu zbudowania modelu teoretycznego cząsteczka metanolu z tej struktury krystalograficznej została zastąpiona cząsteczką wody, co skutkowało uzyskaniem w obliczeniach takiego ułożenia mostu ansamycynowego, który bardzo dobrze korelował z danymi uzyskanymi w widmach NMR dla konformera **RFX(B)** (Rysunek 13 c i d, Fig. 4 c i d). Na podstawie widm temperaturowych NMR została wyznaczona bariera energetyczna przekształcenia jednego konformera w drugi i wynosiła ona około 0,5 kcal/mol. Tak niewielka bariera energetyczna zmiany konformacji wskazuje, że taki sposób aranżacji mostu ansamycynowego jest możliwy do utworzenia w roztworze także dla innych rifamycyn, ale tylko w przypadku związków, które w roztworze nie mają możliwości utworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego N(2)H...X(grupa w pozycji C(3)) (np. dla **RFP** N(2)-H...N(38)).

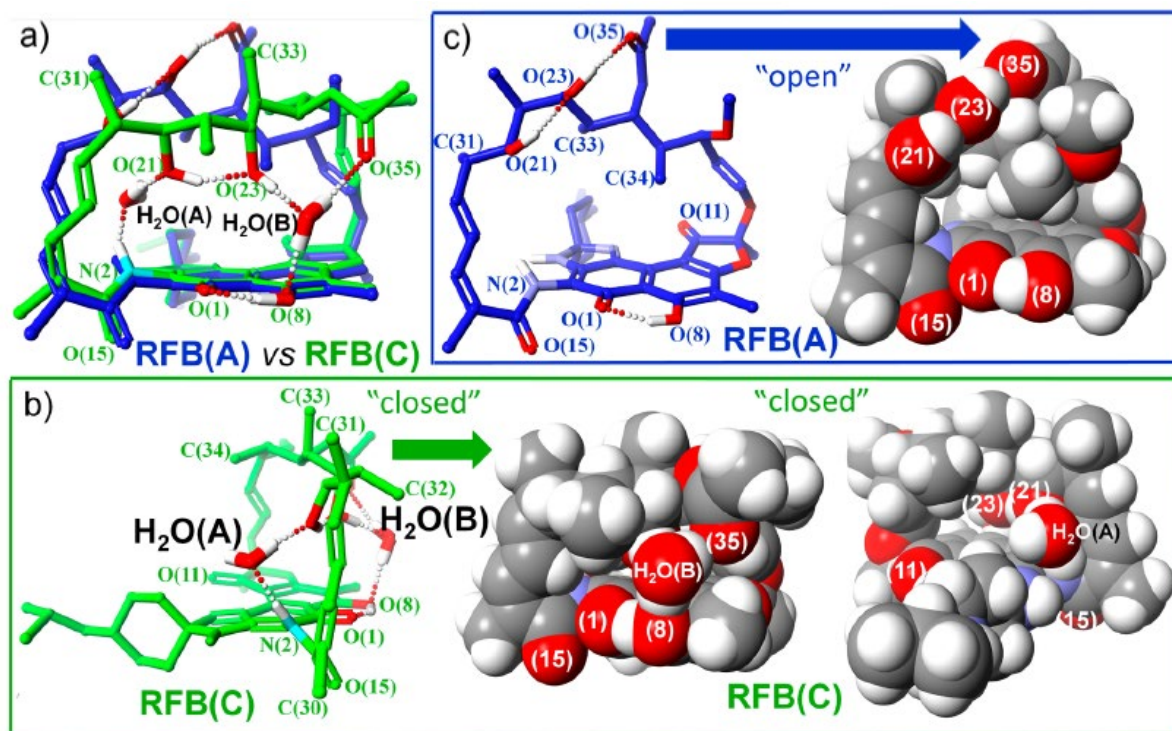


Rysunek 13 (a) Obliczone struktury **RFP(A)**, **RFX(A)** i **RFB(A)** [B88 LYP (GGA) DFT]. (b) struktura X-ray **RMP·3MeOH**. (c) Nałożone obliczone struktury metodą DFT **RFX(A)** i **RFX(B)** od strony laktam-dien. (d) Nałożone obliczone struktury metodą DFT **RFX(A)** i **RFX(B)** widok od strony wnętrza między rdzeniem aromatycznym a mostem ansamycynowym. (e) Nałożone obliczone struktury metodą DFT **RFB(A)** i **RFB(B)** od strony laktam-dien; ruch mostu zaznaczony jest czerwoną strzałką. (f) Nałożone obliczone struktury metodą DFT **RFB(A)** i **RFB(B)** widok od strony wnętrza między rdzeniem aromatycznym a mostem ansamycynowym; ruch mostu zaznaczony jest czerwoną strzałką.

W widmach zarejestrowanych dla **RFB** w  $\text{CDCl}_3$  (Rysunek 12, Fig. 2 w pracy **H8**) obecna była jedna forma, która była zbieżna z **RFP(A)** i **RFX(A)**, więc została nazwana **RFB(A)** (Rysunek 13a, Fig. 4a w pracy **H8**). Konformery typowe A i B posiadały strukturę „otwartą”, w której grupy hydroksylowe z mostu ansamycynowego O(21)H i O(23)H były skierowane „na zewnątrz” – zatem te konformery wykazują zdolność wiązania się z RNAP (Rysunek 14c, Fig. 5c w pracy **H8**). W widmie **RFB** w  $\text{DMSO-d}_6+\text{H}_2\text{O}$  w temperaturze pokojowej widoczne były dwa zestawy sygnałów (Rysunek 12, Fig. 2 w pracy **H8**). Jeden z nich odpowiadał konformerowi **RFB(A)** natomiast ten drugi był zupełnie inny i został przypisany do konformeru **RFB(C)**. Analizując przesunięcia chemiczne w widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR można było dostrzec różnice praktycznie w każdej części mostu ansamycynowego. Różnica w położeniu sygnału od protonu H(34) dla **RFB(A)** ( $\delta = -0.24$  ppm) i **RFB(C)** ( $\delta = 0.90$  ppm) wskazywała, że grupa metylowa C(34) dla **RFB(C)** jest usytuowana z dala od rdzenia aromatycznego. Co więcej, sygnały od protonów H17–H19 protonów wskazywały na inną orientację tego fragmentu w **RFB(C)** i **RFB(A)**. Dla **RFB(C)**, sygnał od karbonyłowego atomu węgla C(15) był odsłaniany i przesunął się o 5 ppm w porównaniu do **RFB(A)**

wskazując na słabsze lub całkowite utracenie sprzężenia pomiędzy układem dienowym a laktamem w **RFB(C)**. Analiza kontaktów w widmach  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (Fig. 3 e w pracy **H8**) jednoznacznie potwierdziła, że konformacja **RFB(C)** przyjmuje formę zamkniętą, gdyż tylko schowanie „do środka” alifatycznych grup hydroksylowych umożliwia uzyskanie zgodności modelu teoretycznego z danymi eksperymentalnymi (Rysunek 14b, Fig. 5b w pracy **H8**). Po raz kolejny nasuwało się pytanie, w jaki sposób taka struktura jest stabilizowana. Częściowej odpowiedzi na to pytanie udzieliła konformacja typu-B, w której obecna jest cząsteczka wody. Jednak do stabilizacji struktury **RFB(C)** nie wystarczy jedna taka cząsteczka, co potwierdziły wyniki uzyskane z analizy widm FT-IR, w których maksymalne kontinuum absorpcji zostało osiągnięte dla dwóch cząsteczek wody (Fig. 3f i g w pracy **H8**). Mając do dyspozycji takie informacje można było przystąpić do zbudowania modelu teoretycznego, który umożliwił zwizualizowanie struktury **RFB(C)** ukazując, że rola pierwszej cząsteczki wody jest podobna do tej w konformerze typu-B (Rysunek 13e, Rysunek 14b, Fig. 4e i 5b w pracy **H8**). Natomiast druga cząsteczka wody jest niezbędna do zachowania kolektywnego układu wiązań wodorowych, między grupą N(2)H i karbonylowym atomem tlenu O(35), łącząc grupę O(23)H z grupą acetylową. Dodatkowo takie ułożenie drugiej cząsteczki wody w tej strukturze umożliwia wydłużenie/rozwidlenie kolektywnego układu wiązań wodorowych o grupę fenolową O(8)H i chinonowy atom tlenu O(1). Wyznaczona na podstawie pomiarów NMR wartość bariery przekształcenia from **RFB(A)** w **RFB(C)** wynosi między 3,5 a 6,5 kcal/mol i jest to wartość zależna od rozpuszczalnika. Warto w tym miejscu dodać, że stosunek tych dwóch konformerów jest ściśle zależny od temperatury i w temperaturze 65°C dominuje forma A (1:0,38) natomiast w -25°C przeważa forma C (2,28:1) (Fig. 3i w pracy **H8**). Podobnie jak w przypadku konformeru typu-B dla **RFX** podobnie konformer typu-C może być realizowany przez inne rifamycyny (bez obecności w strukturze wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego N(2)H...X(grupa w pozycji C(3)), co zostało przedstawione w modelu teoretycznym dla **RFX** (Fig. 5f w pracy **H8**). Z punktu widzenia lepszej aktywności **RFB** i **RFX** w stosunku do bakterii Gram-ujemnych możliwość przyjęcia zamkniętej konformacji pokazuje, że antybiotyki te mogą płynnie zmieniać swoją strukturę wpływając na właściwości lipofilowo-hydrofobowe i w ten sposób przenikać do wnętrza bakterii nie tylko Gram-dodatnich ale też Gram-ujemnych, w przeciwieństwie do **RMP** i **RFP** aktywnych tylko wobec szczepów Gram-dodatnich (Rysunek 14b).





Rysunek 14 Obliczone metodą DFT i nałożone struktury RFB(A) i RFB(C)+2H<sub>2</sub>O widok od strony wnętrza między rdzeniem aromatycznym a mostem ansamcynowym. (b) obliczona metodą DFT struktura RFB(C)+2H<sub>2</sub>O, widoczna jest konformacja „zamknięta”, wodok od strony laktam-dien. (c) obliczona metodą DFT struktura RFB(A) widoczna jest konformacja „otwarta”, widok od strony wnętrza między rdzeniem a mostem ansamcynowym.

### 4.3.3 Podsumowanie

Przedłożone opracowanie będące podstawą postępowania habilitacyjnego doskonale wpisuje się w obecne trendy i potrzeby ciągłego udoskonalania arsenału nowych lub modyfikowanych antybiotyków. Niezwykle szybki proces rozmnażania bakterii oraz zdolność i łatwość tych mikroorganizmów do przystosowywania się do nowych warunków powoduje, że nasz gatunek jest nieustannie narażony na ich atak. Dodatkowym czynnikiem, który powoduje narastanie tego problemu jest lekooporność bakterii (antybiotykooporność). Niestety zjawisko to jest uwarunkowane przede wszystkim przez nadużywanie antybiotyków (przez lekarzy oraz pacjentów). Drobnoustroje za pomocą nabytych mechanizmów uodparniają się na działanie leków – co powoduje, że antybiotyki stają się nieskuteczne w leczeniu chorób bakteryjnych. Przerażające są przewidywania, które wskazują, że w roku 2050 ludzie będą częściej umierać z powodu zakażeń wywołanych opornymi na antybiotyki bakteriami i będzie to jedna z głównych przyczyn zgonów porównywalna ze statystykami umieralności spowodowanej przez nowotwory.<sup>34,35</sup> Z tego powodu bardzo ważne jest poszukiwanie nowych środków przeciwbakteryjnych i modyfikacji / otrzymanie analogów

antybiotyków, które będą przeciwstawiały się bakteriom uodpornionym na stosowane antybiotyki.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionego opracowania zaliczam:

- I. Wykazanie, że w roztworach zawierających cząsteczki wody rifamycyn (**RFB** i **RFX**) uzyskują labilność konformacyjną mostu ansamycynowego i są w stanie równowagi między konformerem „zamkniętym” (charakter hydrofobowy) i „otwartym” (charakter hydrofilowy), co wpływa na wyższą aktywność **RFB** i **RFX** w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, w porównaniu do **RMP** i **RFP**
- II. Ustalenie na podstawie analizy widm NMR, że **RFB** występuje wyłącznie w formie niejonowej w roztworach, podczas gdy **RFX** w formie jonowej z protonem przeniesionym z grupy fonolowej O(8)H na amidynowy układ spinający pozycje C(3)/C(4)
- III. Otrzymanie serii nowych aminowych analogów **RMP**, w tym 63 aminowych analogów rifampicyny zawierających w swojej strukturze zróżnicowane podstawniki w pozycji C(3), 10 heterocyklicznych pochodnych zawierających układ 3,4-dihydrobenzo[g]chinazolinowy oraz 10 hydrazonów **Ral**.
- IV. Ustalenie na podstawie danych spektroskopowych struktur otrzymanych pochodnych
- V. Wykazanie na podstawie analizy FT-IR, że układy benzokoronowe mogą pełnić rolę zasady w wewnątrzcząsteczkowym procesie przenoszenia protonu w aminowych analogach **Rif**.
- VI. Przeprowadzenie analizy SAR dla otrzymanych związków z grupy ansamycyn i wykazanie na podstawie obliczonych modeli, że za wysoką aktywność przeciwbakteryjną odpowiada możliwość oddziaływania z glutaminianem E<sub>445</sub>.
- VII. Ustalenie, że do oddziaływania z glutaminianem E<sub>445</sub> protonowane centrum zasadowe powinno znajdować się na stosunkowo sztywnym ramieniu przyłączonym do pozycji C(3).
- VIII. Wykazanie na podstawie badań CP/MAS NMR i FT-IR, że sposób oczyszczania / izolacji **Rif** ma wpływ na strukturę tego antybiotyku w ciele stałym i należy ten fakt brać pod uwagę przy ilościowym i jakościowym oznaczaniu tego związku w formulacji farmaceutycznej
- IX. Zaprojektowanie syntezy triazolowych pochodnych gossypolu i otrzymanie 8 nowych Zasad Schiffa gossypolu.

- X. Wykazanie, że otrzymane pochodne gossypolu posiadają wyższą aktywność przeciwgrzybiczą niż macierzysty gossypol.
- XI. Ustalenie, że za aktywność przeciwgrzybiczą gossypolu i jego zasad Schiffa odpowiada inhibicja procesu biosyntezy ergosterolu.

#### 4.3.4 Wykaz użytych skrótów w kolejności alfabetycznej

ACN - acetonitryl

<sup>13</sup>C NMR – węglowa spektroskopia rezonansu magnetycznego

CP/MAS – "Cross Polarization Magic Angle Spinning",

*F. acuminatum* – *Fusarium acuminatum*

FT-IR – spektroskopia fourierowska w podczerwieni

G+ – bakterie Gram-dodatnie

G– – bakterie Gram-ujemne

logP – współczynnik lipofilowości

MeOH - metanol

MIC – minimalne stężenie inhibicji

NMR – spektroskopia rezonansu magnetycznego

<sup>1</sup>H NMR – protonowa spektroskopia rezonansu magnetycznego

*R. stolonifer* - *Rhizopus stolonifer*

Ral – 3-formylorifamycyna SV

RFB – ryfabutyna

RFP – rifapentyna

RFX – rifaksymina

Rif – rifampicyna

RMP - rifampicyna

RNAP – bakteryjna polimeraza RNA

SAR – zależność struktura-aktywność

*S. epidermidis* – *Staphylococcus epidermidis*

#### 4.3.5 Spis cytowanej literatury

- (1) Przybylski, P.; Huczynski, A.; Pyta, K.; Brzezinski, B.; Bartl, F. Biological Properties of Schiff Bases and Azo Derivatives of Phenols. *COC* **2009**, *13* (2), 124–148. <https://doi.org/10.2174/138527209787193774>.
- (2) Jaroszewski, J. W.; Strøm-Hansen, T.; Hansen, L. L. Optical Stability of Gossypol. *Chirality* **1992**, *4* (4), 216–221. <https://doi.org/10.1002/chir.530040403>.
- (3) National, C. G. on M. A. A. Gossypol-a New Antifertility Agent for Males. *Chinese Medical Journal* **1978**, *N4* (06), 417–428. <https://doi.org/10.5555/cmj.0366-6999.N4.06.p417.01>.



- (4) Wang, X.; Wang, J.; Wong, S. C. H.; Chow, L. S. N.; Nicholls, J. M.; Wong, Y. C.; Liu, Y.; Kwong, D. L. W.; Sham, J. S. T.; Tsao, S. W. Cytotoxic Effect of Gossypol on Colon Carcinoma Cells. *Life Sciences* **2000**, *67* (22), 2663–2671. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00857-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00857-2).
- (5) Ak, T.; Pv, D.; A, P.; Si, K.; Ma, A.; La, W.; Bl, T. An Alpha-Proteobacterial Type Malate Dehydrogenase May Complement LDH Function in Plasmodium Falciparum. Cloning and Biochemical Characterization of the Enzyme. *European journal of biochemistry* **2004**, *271* (17). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04281.x>.
- (6) Royer, R. E.; Mills, R. G.; Young, S. A.; Vander Jagt, D. L. Comparison of the Antiviral Activities of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) and Gossylic Iminolactone (GIL) against Clinical Isolates of HIV-1. *Pharmacological Research* **1995**, *31* (1), 49–52. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(95\)80047-6](https://doi.org/10.1016/1043-6618(95)80047-6).
- (7) Royer, R. E.; Mills, R. G.; Deck, L. M.; Mertz, G. J.; Vander Jagt, D. L. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type I Replication by Derivatives of Gossypol. *Pharmacological Research* **1991**, *24* (4), 407–412. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(91\)90045-Y](https://doi.org/10.1016/1043-6618(91)90045-Y).
- (8) Przybylski, P.; Pyta, K.; Stefańska, J.; Ratajczak-Sitarz, M.; Katrusiak, A.; Huczyński, A.; Brzezinski, B. Synthesis, Crystal Structures and Antibacterial Activity Studies of Aza-Derivatives of Phytoalexin from Cotton Plant – Gossypol. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44* (11), 4393–4403. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.032>.
- (9) Przybylski, P.; Pyta, K.; Remlein-Starosta, D.; Schroeder, G.; Brzezinski, B.; Bartl, F. Antifungal Activity of Alkyl and Heterocyclic Aza-Derivatives of Gossypol as Well as Their Complexes with NaClO<sub>4</sub> against *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Lupini*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (7), 1996–2000. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.051>.
- (10) Lordelo, M. M.; Davis, A. J.; Calhoun, M. C.; Dowd, M. K.; Dale, N. M. Relative Toxicity of Gossypol Enantiomers in Broilers. *Poultry Science* **2005**, *84* (9), 1376–1382. <https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1376>.
- (11) Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; McCaffery, A. Mechanisms Influencing the Evolution of Resistance to Qo Inhibitor Fungicides. *Pest Management Science* **2002**, *58* (9), 859–867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>.
- (12) Klix, M. B.; Verreet, J.-A.; Beyer, M. Comparison of the Declining Triazole Sensitivity of *Gibberella Zeae* and Increased Sensitivity Achieved by Advances in Triazole Fungicide Development. *Crop Protection* **2007**, *26* (4), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.006>.
- (13) Lepesheva, G. I.; Hargrove, T. Y.; Anderson, S.; Kleshchenko, Y.; Furtak, V.; Wawrzak, Z.; Villalta, F.; Waterman, M. R. Structural Insights into Inhibition of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase in the Human Pathogen *Trypanosoma Cruzi*\*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (33), 25582–25590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.133215>.
- (14) Lepesheva, G. I.; Park, H.-W.; Hargrove, T. Y.; Vanhollebeke, B.; Wawrzak, Z.; Harp, J. M.; Sundaramoorthy, M.; Nes, W. D.; Pays, E.; Chaudhuri, M.; Villalta, F.; Waterman, M. R. Crystal Structures of *Trypanosoma Brucei* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Implications for Selective Treatment of Human Infections\*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (3), 1773–1780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067470>.
- (15) Nett, J. E.; Andes, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America* **2016**, *30* (1), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>.

- (16) O'Meara, T. R.; Veri, A. O.; Ketela, T.; Jiang, B.; Roemer, T.; Cowen, L. E. Global Analysis of Fungal Morphology Exposes Mechanisms of Host Cell Escape. *Nat Commun* **2015**, *6* (1), 6741. <https://doi.org/10.1038/ncomms7741>.
- (17) Skrzypczak, N.; Przybylski, P. Modifications, Biological Origin and Antibacterial Activity of Naphthalenoid Ansamycins. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39* (9), 1653–1677. <https://doi.org/10.1039/D2NP00002D>.
- (18) Pyta, K.; Przybylski, P.; Wicher, B.; Gdaniec, M.; Stefańska, J. Intramolecular Proton Transfer Impact on Antibacterial Properties of Ansamycin Antibiotic Rifampicin and Its New Amino Analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (12), 2385–2388. <https://doi.org/10.1039/C2OB00008C>.
- (19) Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* **2001**, *104* (6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0).
- (20) Bacchi, A.; Pelizzi, G.; Nebuloni, M.; Ferrari, P. Comprehensive Study on Structure–Activity Relationships of Rifamycins: Discussion of Molecular and Crystal Structure and Spectroscopic and Thermochemical Properties of Rifamycin O. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (13), 2319–2332. <https://doi.org/10.1021/jm970791o>.
- (21) Sippel, A.; Hartmann, G. Mode of Action of Rifamycin on the RNA Polymerase Reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **1968**, *157* (1), 218–219. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(68\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(68)90286-4).
- (22) Umezawa, H.; Mizuno, S.; Yamazaki, H.; Nitta, K. INHIBITION OF DNA-DEPENDENT RNA SYNTHESIS BY RIFAMYCINS. *J. Antibiot.* **1968**, *21* (3), 234–236. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.21.234>.
- (23) Floss, H. G.; Yu, T.-W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 621–632. <https://doi.org/10.1021/cr030112j>.
- (24) Pyta, K.; Przybylski, P.; Klich, K.; Stefańska, J. A New Model of Binding of Rifampicin and Its Amino Analogues as Zwitterions to Bacterial RNA Polymerase. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (41), 8283–8297. <https://doi.org/10.1039/C2OB26317C>.
- (25) Santos, L.; Medeiros, M. A.; Santos, S.; Costa, M. C.; Tavares, R.; Curto, M. J. M. NMR Studies of Some Rifamycins. *Journal of Molecular Structure* **2001**, *563–564*, 61–78. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00871-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00871-1).
- (26) Agrawal, S.; Ashokraj, Y.; Bharatam, P. V.; Pillai, O.; Panchagnula, R. Solid-State Characterization of Rifampicin Samples and Its Biopharmaceutic Relevance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *22* (2), 127–144. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.02.011>.
- (27) Rozwadowski, Z. Chapter 3 - NMR Studies of Optically Active Schiff Bases. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, G. A., Ed.; Academic Press, 2011; Vol. 74, pp 125–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097072-1.00003-0>.
- (28) Chierotti, M. R.; Gobetto, R. Solid-State NMR Studies on Supramolecular Chemistry. In *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc026>.
- (29) Kinz-Thompson, C.; Conwell, E. Proton Transfer in Adenine–Thymine Radical Cation Embedded in B-Form DNA. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1* (9), 1403–1407. <https://doi.org/10.1021/jz100214h>.
- (30) Wiley-VCH - *Advances in Chemical Physics, Volume 111* (Eds. I. Prigogine, S. A.

Rice), John Wiley & Sons. Inc., New York, 2000.

- (31) Wehrli, W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Reviews of Infectious Diseases* **1983**, 5 (Supplement\_3), S407–S411. [https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement\\_3.S407](https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_3.S407).
- (32) Smith, P. A.; Koehler, M. F. T.; Girgis, H. S.; Yan, D.; Chen, Y.; Chen, Y.; Crawford, J. J.; Durk, M. R.; Higuchi, R. I.; Kang, J.; Murray, J.; Paraselli, P.; Park, S.; Phung, W.; Quinn, J. G.; Roberts, T. C.; Rougé, L.; Schwarz, J. B.; Skippington, E.; Wai, J.; Xu, M.; Yu, Z.; Zhang, H.; Tan, M.-W.; Heise, C. E. Optimized Arylomycins Are a New Class of Gram-Negative Antibiotics. *Nature* **2018**, 561 (7722), 189–194. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0483-6>.
- (33) Fisher, J. F.; Mobashery, S. Endless Resistance. Endless Antibiotics? *Med. Chem. Commun.* **2016**, 7 (1), 37–49. <https://doi.org/10.1039/C5MD00394F>.
- (34) *Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations / the Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill*. Wellcome Collection. <https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba> (accessed 2023-09-25).
- (35) *GLASS manual for antimicrobial resistance surveillance in common bacteria causing human infection*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240076600> (accessed 2023-09-25).

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W okresie od lipca do końca grudnia 2022 roku byłem wizytującym naukowcem w Zakładzie Chemii Biofizycznej w Instytucie Biologii na Uniwersytecie Humbolta w Berlinie (1.07.2022-31.12.2022, nr projektu: D.00506.02.211200). Wynikiem tej współpracy międzynarodowej jest publikacja „*Cascade transformation of the ansamycin benzoquinone core into benzoxazole influencing anticancer activity and selectivity*”, która ukazała się w 2023 roku na łamach czasopisma *The Journal of Organic Chemistry (J. Org. Chem., 87, (2023), DOI: 10.1021/acs.joc.3c00493 - [link](#))* (kopia pracy w załączniku nr 8). W pracy tej mam podwójną afiliację, Wydział Chemii UAM i Institut für Biologie, Biophysikalische Chemie Humboldt-Universität zu Berlin.

W okresie po doktoracie odbyłem kilka krótkoterminowych szkoleń z wykorzystania różnicowej spektroskopii w podczerwieni do badań fotoreceptorów retinalu. Szkolenie organizowane przez Prof. dr Franza Bartla; Niemcy; Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité – Universitätsmedizin Berlin; 15.11-20.11.2015, 11.02-18.02.2017, 04.10.-08.10.2017 i 16.02-24.02.2018. (potwierdzenie w załączniku nr 8)

### 5.1 Współpraca z naukowcami z krajowych oraz zagranicznych ośrodków badawczych

Ze względu na interdyscyplinarny charakter prowadzonych przeze mnie badań, niezbędna jest ścisła współpraca z innymi naukowcami z zagranicznych i krajowych ośrodków badawczych. Spośród liderów zespołów, z którymi współpracowałem, należy wymienić następujące osoby (kolejność uwzględnia sumaryczną liczbę prac):

- 1) Prof. dr Franz Bartl z Zakładu Chemii Biofizycznej, Instytutu Biologii na Uniwersytecie Humbolta w Berlinie (wcześniej Zakład Fizyki Medycznej i Biofizyki na Uniwersytecie Medycznym-Charité w Berlinie) – szeroko zakrojona współpraca obejmująca między innymi konsultacje spektroskopowe, 11 wspólnych publikacji (2 przed doktoratem, 9 po doktoracie),
- 2) Prof. dr hab. Marzena Gajęcka z Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – testy aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, 6 wspólnych publikacji (wszystkie po doktoracie),
- 3) Dr Piotr Ruszkowski z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – testy aktywności przeciwnowotworowej, 6 wspólnych publikacji (wszystkie po doktoracie),
- 4) Prof. ICHO dr hab. Wojciech Schilf z Instytutu Chemii Organicznej PAN – badania NMR, 6 wspólnych publikacji (2 przed doktoratem, 4 po doktoracie),
- 5) Dr hab. n. farm. Joanna Stefańska z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny – testy aktywności przeciwbakteryjnej, 4 wspólne publikacje (wszystkie przed doktoratem),
- 6) Prof. dr hab. Eugeniusz Grech z Wydziału Chemii Nieorganicznej i Organicznej, Uniwersytet Zachodniopomorski w Szczecinie – badania zasad Schiffa i ich kompleksów, 3 wspólne publikacje (2 przed doktoratem, 1 po doktoracie),
- 7) Prof. dr hab. Marek Murias z Wydziału toksykologii, Poznański Uniwersytet Medyczny – testy aktywności przeciwnowotworowej, 1 wspólna publikacja (po doktoracie)
- 8) Prof. dr hab. Krzysztof Woźniak z Wydziału Chemii, Uniwersytetu Warszawskiego – pomiary struktur krystalograficznych, 1 wspólna publikacja (po doktoracie)

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę

Od 2020 roku jestem członkiem Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza na kadencję 2020–2024. W trakcie mojej kariery naukowej od pierwszego roku doktoratu byłem zaangażowany w prowadzenie zajęć dydaktycznych: laboratoryjnych, ćwiczeń i proseminariów dla studentów chemii i biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (Tabela 4).

Tabela 4 Prowadzone zajęcia dydaktyczne dla studentów.

<p><b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Biochemia z elementami biologii – zajęcia laboratoryjne i proseminaria</li> <li>ii. Podstawy chemii organicznej – zajęcia laboratoryjne</li> </ul>
<p><b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Podstawy chemii organicznej – ćwiczenia</li> <li>ii. Biochemia z elementami biologii – ćwiczenia i zajęcia laboratoryjne</li> <li>iii. Chemia organiczna (I MU) – zajęcia laboratoryjne</li> <li>iv. Biochemia – ćwiczenia i zajęcia laboratoryjne</li> <li>v. Biochemia II – zajęcia laboratoryjne</li> <li>vi. Biochemia sądowa – zajęcia laboratoryjne</li> <li>vii. Spektroskopia molekularna – zajęcia laboratoryjne</li> <li>viii. Podstawy chemii produktów naturalnych – zajęcia laboratoryjne</li> </ul>

Od roku 2012 pełnię rolę kierownika laboratoriów z Biochemii i Biochemii z elementami biologii. Do zajęć laboratoryjnych z Biochemii II i Biochemii sądowej opracowałem ćwiczenia laboratoryjne – na zajęciach tych również pełnię rolę kierownika. Dodatkowo jestem autorem sylabusu z „Toksykologii leków” (wykład) – przedmiotu, który jest przewidziany dla studentów „Chemii medycznej z projektowaniem leków”, otwarcie tego kierunku jest planowane w nadchodzącym roku akademickim.

Pełniłem rolę opiekuna naukowego licznych prac magisterskich (Tabela 5). Byłem również promotorem pracy magisterskiej Pani Klaudii Tokarskiej pt.: „Struktura i właściwości fizykochemiczne pochodnych heterocyklicznych w pozycji C(17) produktu naturalnego geldanamycyny”. Jestem także promotorem pomocniczym trzech prac doktorskich, które zostały obronione z wyróżnieniem (Tabela 5). Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że żadna z publikacji naukowych powstałych w ramach tych prac doktorskich nie jest częścią mojego wniosku habilitacyjnego.

Tabela 5 Lista promowanych prac doktorskich i magisterskich. Opieka naukowa nad studentami

<p><b>Promotor pomocniczy prac doktorskich</b></p> <p>I. Dr Katarzyna Klich, data nadania stopnia: 08.07.2016 r. - praca wyróżniona przez obu Recenzentów i RWCH UAM  <i>„Funkcjonalizacja aglikonu Spiramycyny przez zastosowanie regio- i stereoselektywnych reakcji kaskadowych”</i></p> <p>II. Dr Joanna Domagalska, data nadania stopnia: 08.07.2016 r. - praca wyróżniona przez obu Recenzentów i RWCH UAM  <i>„Modyfikacja aglikonu josamycyny z wykorzystaniem regioselektywnej substancji nukleofilowej typu SN1' i dipolarnej cykloaddycji Huisgena”</i></p> <p>III. Dr Anna Janas, data nadania stopnia: 21.05.2021 r. - praca wyróżniona przez obu Recenzentów i RWCH UAM  <i>„Synteza i ustalenie korelacji struktura-aktywność biologiczna nowych pochodnych 14- i 15-członowych antybiotyków makrolidowych zawierających przebudowane ramiona sacharydowe”</i></p> <p><b>Promotor pracy magisterskiej</b></p> <p>I. Mgr Klaudia Tokarska, data nadania stopnia: 14.06.2023  <i>„Struktura i właściwości fizykochemiczne pochodnych heterocyklicznych w pozycji C(17) produktu naturalnego geldanamycyny”</i></p>
<p><b>Opieka nad magistrantami</b></p> <p><b>przed doktoratem</b></p> <p>I. Mgr Katarzyna Klich, 2012 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza i właściwości spektroskopowe nowych pochodnych 3-formylorifamycyny SV”</i></p> <p>II. Mgr Anna Olsztyńska, 2012 rok, tytuł pracy: <i>„The application of copper (I) catalysed Huisgen cycloaddition in synthesis of novel 3-formylrifamycin derivatives”</i></p> <p><b>po doktoracie</b></p> <p>I. Mgr Joanna Domagalska, 2013 rok, tytuł pracy: <i>„Regioselektywne przeniesienie protonu w pochodnych 3-formyloryfamycyny SV”</i></p> <p>II. Mgr Alicja Matuszak, 2013 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza i charakterystyka drugorzędowych amin dibenzylowych zawierających w swoich strukturach atomy fluorowców w pozycjach meta i para pierścienia fenylowego”</i></p> <p>III. Mgr Katarzyna Siwiak, 2014 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych pochodnych 3-formylorifamycyny SV zawierających w strukturze etery koronowe.”</i></p> <p>IV. Mgr Marietta Blecha, 2015 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza i struktura nowych triazolowych pochodnych gossypolu”</i></p> <p>V. Mgr Katarzyna Barczak, 2015 rok, tytuł pracy: <i>„Modyfikacja 3-formylorifamycyny SV za pomocą reakcji aminowania redukcyjnego z aminami zawierającymi w strukturze grupę amidową”</i></p> <p>VI. Mgr Anna Buła, 2015 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza i badania spektroskopowe nowych rifamycyn zawierających w swojej strukturze aniliny”</i></p> <p>VII. Mgr Grzegorz Iwanowicz, 2016 rok, tytuł pracy: <i>„Synteza nowych pochodnych hydrazonowych półsyntetycznej 3 formyloryfamycyny SV”</i></p>

VIII.	Mgr Paulina Roesler, 2017 rok, tytuł pracy: „ <i>Synteza i analiza strukturalna nowych pochodnych ryfamycyn posiadających w strukturze centra zasadowe</i> ”
IX.	Mgr Natalia Skrzypczak, 2019 rok, tytuł pracy: „ <i>Nowe triazolowe pochodne kolchicineiny w pozycji C-9 i C-10 pierścienia tropolonowego, jako potencjalne środki przeciwnowotworowe</i> ”
X.	Mgr Monika Szukowska, 2020 rok, tytuł pracy: „ <i>Synteza i struktura nowych analogów ryfamycyn zawierających ugrupowania amin trzeciorzędowych</i> ”
XI.	Mgr Patryk Kalinowski, 2021 rok, tytuł pracy: „ <i>Functionalization of 16-membered aglycone of spiramycin via intramolecular cascade reactions</i> ”
XII.	Mgr Ewelina Smolarz, 2023 rok, tytuł pracy: „ <i>Functionalization of 16-membered aglycone of spiramycin via intramolecular cascade reactions</i> ”
XIII.	Mgr Anna Smoczyńska, 2023 rok, tytuł pracy: „ <i>Synteza nowych pochodnych Spiramycyny zawierających sfunkcjonalizowane ramiona pirolidyno-triazolowe</i> ”

Promotorem wszystkich prac dyplomowych był prof. dr hab. Piotr Przybylski

Oprócz pełnienia roli promotora pomocniczego w pracach doktorskich i opiekuna naukowego prac laboratoryjnych studentów będących w trakcie prowadzenia swoich badań do prac magisterskich byłem również recenzentem kilku prac licencjackich realizowanych na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (Tabela 6). Byłem również powoływany na recenzenta kilku artykułów naukowych wysłanych do różnych wydawnictw (Tabela 6).

Tabela 6 Lista wykonanych recenzji prac licencjackich i artykułów naukowych

<b>Recenzje prac licencjackich</b>	
I.	lic. Ewelina Nowak, 2021, tytuł pracy: „ <i>Modyfikacja w pozycji C-17 geldanamycyny w projektowaniu nowych środków przeciwnowotworowych</i> ”
II.	lic. Patryk Kalinowski, 2019, tytuł pracy: „ <i>Oporność różnych szczepów bakterii na laktonowe antybiotyki makrolidowe</i> ”
III.	lic. Daniel Walczak, 2018, tytuł pracy: „ <i>Antybiotyki ansamycynowe i leukomycyny - struktura i mechanizmy działania</i> ”
IV.	lic. Monika Szukowska, 2018, tytuł pracy: „ <i>Mechanizmy oporności bakterii na stosowane antybiotyki z grupy makrolidów</i> ”
V.	lic. Maria Szyszka, 2017, tytuł pracy: „ <i>Makrolidy pochodzenia naturalnego - struktura i właściwości biologiczne</i> ”
VI.	lic. Oskar Kubiczek, 2016, tytuł pracy: „ <i>Procesy wewnątrz- i międzycząsteczkowe przenoszenia protonu</i> ”
VII.	lic. Marta Biernaczyk, 2016, tytuł pracy: „ <i>Wykorzystanie spektroskopii NMR 1 i 2D na wybranych związkach naturalnych</i> ”
VIII.	lic. Barbara Stańska, 2015, tytuł pracy: „ <i>Zastosowanie makrolidów w terapii przeciwbakteryjnej - wybrane przykłady</i> ”
IX.	lic. Paulina Roesler, 2015, tytuł pracy: „ <i>Flawonoidy - struktura i właściwości biologiczne</i> ”
X.	lic. Dominika Czerwonka, 2015, tytuł pracy: „ <i>Ansamakrolidy - struktura i aktywność biologiczna</i> ”



recenzje artykułów naukowych		
nazwa czasopisma	IF <sub>5-letni</sub>	liczba recenzji
<i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i>	2,6	3
<i>Journal of Spectroscopy</i>	2,4	3
<i>Molecules</i>	4,9	2
<i>Pharmaceuticals</i>	4,9	1
<i>Current Organic Synthesis</i>	2,0	1
<i>Future Medicinal Chemistry</i>	4,2	1
<i>Journal of Molecular Structure</i>	3,2	1
<i>Letters in Organic Chemistry</i>	0,7	1
<b>sumarycznie</b>		<b>13</b>

Wyniki badań, w których brałem udział były ponadto prezentowane na licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych w postaci prezentacji ustnych lub posterowych (Tabela 7).

Tabela 7 Lista wystąpień konferencyjnych.

przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora
1. <i>Central European School on Physical Organic Chemistry</i> , 08-12 czerwiec <b>2008</b> , Karpacz, P. Przybylski, J. Kira, <u>K. Pyta</u> , A. Huczyński, G. Schroeder, B. Brzezinski, P. Barczyński „Complexation properties of aza-derivatives of gossypol toward silver (I) cations investigated by potentiometric, ESI MS, spectroscopic and semiempirical methods”, POSTER
2. Konwersatorium krystalograficzne <b>czerwiec 2008 Wrocław</b> , B. Wicher, <u>K. Pyta</u> , M. Gdaniec, P. Przybylski, „Solwaty rifampicyny”, POSTER
3. <i>Central European School on Physical Organic Chemistry</i> , 02-06 czerwiec <b>2009</b> , Przesieka. <u>K. Pyta</u> , P. Przybylski, D. Remlein-Starosta, G. Schroeder, B. Brzezinski, „Antifungal activity of alkyl and heterocyclic aza-derivatives of gossypol as well as their complexes with NaClO <sub>4</sub> ”, POSTER
4. <i>42<sup>nd</sup> IUPAC CONGRESS Chemistry Solutions; 2-7 August 2009; SECC, Glasgow, Scotland, UK</i> , P. Przybylski, <u>K. Pyta</u> , B. Brzezinski, „Synthesis, spectroscopic, mass spektrometry and semi-empirical studies of new type aminoalkyl-2,3-unsaturated derivatives of 16-membered natural macrolide antibiotic – Josamycin”, POSTER
5. <i>Central European School on Physical Organic Chemistry</i> , 08-12 czerwiec <b>2010</b> , Przesieka. <u>K. Pyta</u> , P. Przybylski, J. Czupryniak, B. Wicher, M. Gdaniec, T. Ossowski, W. Schilf, E. Grech, B. Kołodziej, A. Szady-Chelmieńska, B. Brzezinski, „Spectroscopic and physico-chemical properties of aza-derivatives present in different tautomeric forms”, POSTER
6. 18th International Conference on Organic Synthesis, Section: Natural Product Chemistry, 1-6 August, <b>2010</b> , Bergen, Norway, P. Przybylski, <u>K. Pyta</u> , B. Brzezinski, „Synthesis and structural investigations of new aza-derivatives of 16-membered macrolide antibiotic – josamycin”, POSTER
7. <i>Central European School on Physical Organic Chemistry</i> , 08-12 czerwiec <b>2011</b> , Przesieka.

K. Pyta, P. Przybylski, „*Spectroscopic and physico-chemical properties of aza-derivatives present in different tautomeric forms*”, POSTER

8. Polish School of Crystallography Chemical Crystallography of the XXI-st Century, 5-11 September **2011**, Gierłoż, B. Wicher, K. Pyta, P. Przybylski, M. Gdaniec, „*Tautomeric forms and conformers of rifampicin in the solid state*”, POSTER

9. Central European School on Physical Organic Chemistry, 07-11.05.**2012**, Przesieka, K. Klich, K. Pyta, A. Olsztyńska, P. Przybylski, J. Stefańska, „*Synthesis and structure of new rifampicin analogues – spectroscopic evidence of the presence of zwitterionic forms*”, POSTER

10. Central European School on Physical Organic Chemistry, 07-11.05.**2012**, Przesieka, A. Olsztyńska, K. Pyta, K. Klich, P. Przybylski, „*Synthesis and structure of new Rifampicin analogues – spectroscopic evidence of the presence of zwitterionic forms*”, Anna Olsztyńska, Krystian Pyta, Katarzyna Klich, Piotr Przybylski, POSTER

#### po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

11. Central European School on Physical Organic Chemistry, 27-31.05.**2013**, Przesieka, K. Klich, K. Pyta, P. Przybylski, „*The E1cB elimination as an efficient method leading to obtain of novel derivatives of leucomycin A3*”, POSTER

12. BIT's 4th Annual International Congress of Medicchem-2013, Chiny, Haikou, 13-16.11.**2013**, K. Pyta, P. Przybylski, K. Klich, J. Domagalska, „*From the Proton Transfer within Structure of Rifamycin Antibiotics to Mechanism of Inhibition of Bacterial RNA Polymerase Dependent on DNA*”, POSTER

13. BIT's 4th Annual International Congress of Medicchem-2013, Chiny, Haikou, 13-16.11.**2013**, K. Pyta, P. Przybylski, K. Klich, J. Domagalska, W. Schilf, B. Kamieński, „*Investigation of proton transfer process in rifampicin in the solid state*”, POSTER

14. Chiralność: od cząsteczki elementarnej do uniwersum, Polska, Poznań, Wydział Chemii UAM, 7.06.**2013**, P. Przybylski, K. Pyta, K. Klich, „*Transformation of josamycin in solution – Michael addition or SN2 substitution*”, POSTER

15. Chiralność: od cząsteczki elementarnej do uniwersum, Polska, Poznań, Wydział Chemii UAM, 7.06.**2013**, P. Przybylski, K. Pyta, J. Domagalska, K. Klich, „*Regioselective proton transfer within 3-formylrifamicin SV derivatives*”, POSTER

16. VIII<sup>th</sup> SYMPOSIUM: Nuclear magnetic resonance in chemistry, physics and biological sciences, Warszawa, 24 – 26 .09.**2014**, K. Klich, K. Pyta, P. Przybylski, „*Application of 1D and 2D NMR spectroscopy to determination of novel spiramycin derivatives structures*”, POSTER

17. VIII<sup>th</sup> SYMPOSIUM: Nuclear magnetic resonance in chemistry, physics and biological sciences, Warszawa, 24 – 26 .09.**2014**, J. Domagalska, K. Pyta, P. Przybylski, „*Application of 1D and 2D NMR spectroscopy to determination of novel josamycin derivatives structures*”, POSTER

18. TETRAHEDRON SYMPOSIUM, 16-19.06.**2015**, Berlin, Niemcy, K. Pyta, M. Blecha, P. Przybylski, „*New Gossypol Schiff bases containing 1,2,3-triazole rings*”, POSTER

19. TETRAHEDRON SYMPOSIUM, 16-19.06.**2015**, Berlin, Niemcy, J. Domagalska, K. Pyta, P. Przybylski, „*Diastereo- and regioselective functionalisation of josamycin aglycone using untypical reaction in dienol system*”, POSTER

20. TETRAHEDRON SYMPOSIUM, 16-19.06.**2015**, Berlin, Niemcy, K. Klich, K. Pyta, P. Przybylski, „*Regio- and Stereospecific functionalization of 16-membered Lactone Aglycone of Macrolide type Antibiotics via Intramolecular cascade reactions*”, POSTER

21. Frontiers in Medicinal Chemistry 2015, 14-16.09.**2015**, Antwerpia, Belgia, K. Pyta, M. Blecha P. Przybylski, „*New Gossypol Schiff bases containing 1,2,3-triazole rings*”, POSTER

22. Frontiers in Medicinal Chemistry 2015, 14-16.09.**2015**, Antwerpia, Belgia, P. Przybylski, K. Klich, J. Domagalska, K. Pyta, „*Stereo- and Regioselective modification of spiramycin and josamycin lactone aglycones as a source of novel type inhibitors of 50S ribosomal subunit*”, POSTER

23. TRAMECHVIII 2015, 11-15.11.**2015**, Antalya, Turcja, K. Pyta, J. Domagalska, P. Przybylski, „*Synthesis of new heterocyclic derivatives of josamycin via S<sub>N</sub>2' and dipolar cycloaddition of CUAAC type*”, POSTER

24. TRAMECHVIII 2015, 11-15.11.2015, Antalya, Turcja, K. Klich, K. Pyta, P. Przybylski, „*Regio- and stereospecific functionalization of 16-membered lactone aglycone of macrolide type antibiotics via intramolecular cascade reactions*”, POSTER
25. TRAMECHVIII 2015, 11-15.11.2015, Antalya, Turcja, P. Przybylski, K. Klich, J. Domagalska, K. Pyta, „*Regio- and stereoselective “cascade” and “click” modifications of macrolide antibiotics as a source of new heterocyclic antibacterial agents*”, PREZENTACJA USTNA
26. XIII Seminarium Doktorantów „Na pograniczu chemii i biologii”, 31.05–3.06.2015 Karpacz, Poland, K. Klich, K. Pyta, P. Przybylski, „*Funkcjonalizacja aglikonu Spiramycyny przez zastosowanie regio- i stereoselektywnych reakcji kaskadowych*”, PREZENTACJA USTNA
27. XIII Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów, „Na pograniczu Chemii i Biologii”, 31.05-01.06.2015 Karpacz, POLAND, J. Domagalska, K. Pyta, P. Przybylski, , PREZENTACJA USTNA „*Modyfikacja aglikonu Josamycyny z wykorzystaniem regioselektywnej substytucji nukleofilowej typu S<sub>N</sub>1’ i dipolarnej cykloaddycji Huisgena*”, PREZENTACJA USTNA
27. XIII Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów, „Na pograniczu Chemii i Biologii”, 31.05-01.06.2015 Karpacz, POLAND, D. Czerwonka, P. Przybylski, K. Pyta, M. Kubicka, M. Gajęcka, F. Bartl, „*Makrolidy - struktura i właściwości koordynacyjne a aktywność biologiczna*”, PREZENTACJA USTNA
28. 58 Zjazd naukowy PTChem, 21-25 wrzesień 2015 Gdańsk, POLAND, D. Czerwonka, J. Domagalska, M. Kubicka, M. Gajęcka, K. Pyta, P. Przybylski, „*Structure and antimicrobial activity of new derivatives of 3-formylryfamycin SV containing crown-ethers and L-amino acids*”, POSTER
29. European Congress on Magnetic Resonance, 5-10.07.2015, Praga, Republika Czeska, J. Domagalska, K. Pyta, P. Przybylski, „*Modyfikation of the aglycone Josamycin using the regioselective nucleophilic substitution S<sub>N</sub>1’ type and dipolar Huisgen cycloaddition*”, POSTER
30. 59 Zjazd naukowy PTChem i SITPChem, 19-23 wrzesień 2016, Poznań, POLAND, P. Przybylski, K. Pyta, K. Klich, J. Domagalska, A. Janas, M. Gajęcka, P. Pecyna, L. Celewicz, P. Ruszkowski, „*Regio- and stereoselective „Cascade” and „Click” modifications of macrolide lactone antibiotics*”, S01W09 (wykład sekcyjny)
31. 59 Zjazd naukowy PTChem i SITPChem, 19-23 wrzesień 2016, Poznań, POLAND, „ J. Domagalska, A. Janas, K. Pyta, P. Pecyna, P. Ruszkowski, L. Celewicz, M. Gajęcka, F. Bartl P. Przybylski, „*Synteza i struktura nowych eterowych C(13)-podstawionych pochodnych leukomycyn*”, POSTER
32. 59 Zjazd naukowy PTChem i SITPChem, 19-23 wrzesień 2016, Poznań, POLAND, D. Czerwonka, K. Pyta, M.M. Kubicka, M. Gajęcka, P. Pecyna, P. Przybylski, J. Domagalska, „*Structure and antibacterial activity of new amino derivatives of 3-formylrifamycin SV containing crown ethers and L-aminoacids*”, POSTER
33. 60 Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 17-21 IX 2017, Wrocław; A. Janas, K. Pyta, P. Przybylski, „*Modyfikacje aglikonu erytromycyny poprzez reakcje dipolarnej cykloaddycji Huisgena*”, POSTER
34. 6<sup>th</sup> IAPC Meeting, Sixth World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery & Third World Conference on ADMET and DMPK, 4-7 IX 2017, Zagrzeb, A. Janas, K. Pyta, K. Pyta-Klich, J. Domagalska P. Przybylski, „*Synthesis, structure, antibacterial and anticancer activity of new macrolide antibiotics analogs*”;; POSTER
35. 2<sup>nd</sup> International Conference on Pharmaceutical Chemistry, 2-4 X 2017, Barcelona, K. Pyta, K. Pyta-Klich, A. Janas, J. Domagalska, P. Przybylski, „*Cascade approach to modification of lactone macrolide antibiotics*”, POSTER
36. 2<sup>nd</sup> International Conference on Pharmaceutical Chemistry, 2-4 X 2017, Barcelona; P. Przybylski, A. Janas, K. Pyta-Klich, J. Domagalska, K. Pyta, Franz Bartl, „*Synthesis, antibacterial and anticancer potency of new lactone and lactam macrolide derivatives*”, PREZENTACJA USTNA
37. 10<sup>th</sup> World Congress on Medicinal Chemistry and Drug, 14-15 VI 2018, Barcelona, A. Janas, K. Pyta, P. Przybylski, „*Synthesis and structure-activity relationship of a new derivatives of 14- and 15-membered macrolide antibiotics containing rebuilt saccharide arms*”, PREZENTACJA USTNA
38. Chemistry Beyond Nature, 21-22 VI 2018, Poznań, M. Szukowska, K. Pyta, A. Janas, P. Pecyna, M. Jaworska, M. Gajęcka, F. Bartl, P. Przybylski, „*Ansa-bridge movement implicated by the presence of different substituents at quinone ring of geldanamycins*”, POSTER
39. 24<sup>th</sup> Conference on Isoprenoids, 9-12 IX 2018, Białystok, A. Janas, K. Pyta, P. Przybylski, „*Synthesis and structure-activity relationship of a new derivatives of 14-,15- and 16-membered macrolide antibiotics containing rebuilt saccharide arms*”, POSTER

40. 24<sup>th</sup> Conference on Isoprenoids, 9-12 IX 2018, Białystok, K. Pyta, M. Szukowska, N. Skrzypczak, A. Janas, M. Gdaniec, P. Przybylski, „*Influence of C-17 substituents at quinone ring on conformational flexibility of geldanamycins*”, POSTER
41. 24<sup>th</sup> Conference on Isoprenoids, 9-12 IX 2018, Białystok, P. Przybylski, N. Skrzypczak, M. Szukowska, K. Pyta, A. Janas, B. Wicher, M. Gdaniec, P. Pecyna, M. Gajęcka, „*Basket-like lactam macrolides – modifications and structure – activity relationship studies*”, PREZENTACJA USTNA
42. 61 Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 17-21 IX 2018, Kraków, N. Skrzypczak, M. Szukowska, K. Pyta, A. Janas, M. Gdaniec, P. Przybylski, „*New quinone-functionalized derivatives of geldanamycin- structure and biological implications*”, POSTER
43. X Poznańska Konferencja Naukowa „Chemia i przemysł”, 30 XI 2018, Poznań, N. Skrzypczak, M. Szukowska, K. Pyta, M. Gdaniec, A. Janas, P. Przybylski, „*Blokowanie funkcji białek chaperonowych (Hsp) przez pochodne geldanamycyny jako efektywna droga do uzyskania środków przeciwnowotworowych*”, POSTER
44. X Poznańska Konferencja Naukowa „Chemia i przemysł”, 30 XI 2018, Poznań, M. Szukowska, N. Skrzypczak, K. Pyta, A. Janas, M. Gdaniec, P. Przybylski, „*Nowe ryfamycynowe inhibitory bakteryjnych polimeraz RNA - synteza i właściwości, aktywność przeciwbakteryjna i molekularny mechanizm działania*”, POSTER
45. IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg 2022”, 3.12.2022, Poznań, E. Smolarz, A. Smoczyńska, K. Pyta, P. Przybylski, „*Synteza nowych-pirolidynowych pochodnych spiramycyny zawierających sfunkcjonalizowane ugrupowanie heterocykliczne wykorzystane w reakcji sprzęgania Hecka*”, POSTER
46. IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg 2022”, 3.12.2022, Poznań, A. Smoczyńska, E. Smolarz, K. Pyta, P. Przybylski, „*Synteza nowych bicyklicznych-pirolidynowych pochodnych spiramycyny zawierających sfunkcjonalizowane ugrupowanie heterocykliczne wykorzystywane do reakcji cykloaddycji Huisgena*”, POSTER

## 7. Pozostałe istotne informacje dotyczące pracy naukowej

### 7.1 Dorobek naukowy

W trakcie mojej kariery naukowej zajmowałem się kilkoma związkami pochodzenia naturalnego lub ich syntetycznymi pochodnymi. Związki te to przede wszystkim antybiotyki makrocykliczne – ansamycyny (rifampicyna i jej analogi oraz geldanamycyna) oraz makrolidy laktonowe 14-członowe (klarytromycyna), 15-członowe (azytromycyna) i 16-członowe (josamycyna i spiramycyna). Innym związkiem, który wzbudził moje zainteresowanie był gossypol (polifenolowy biseskwiterpen) i kolchiceina (alkaloid tropolonowy).

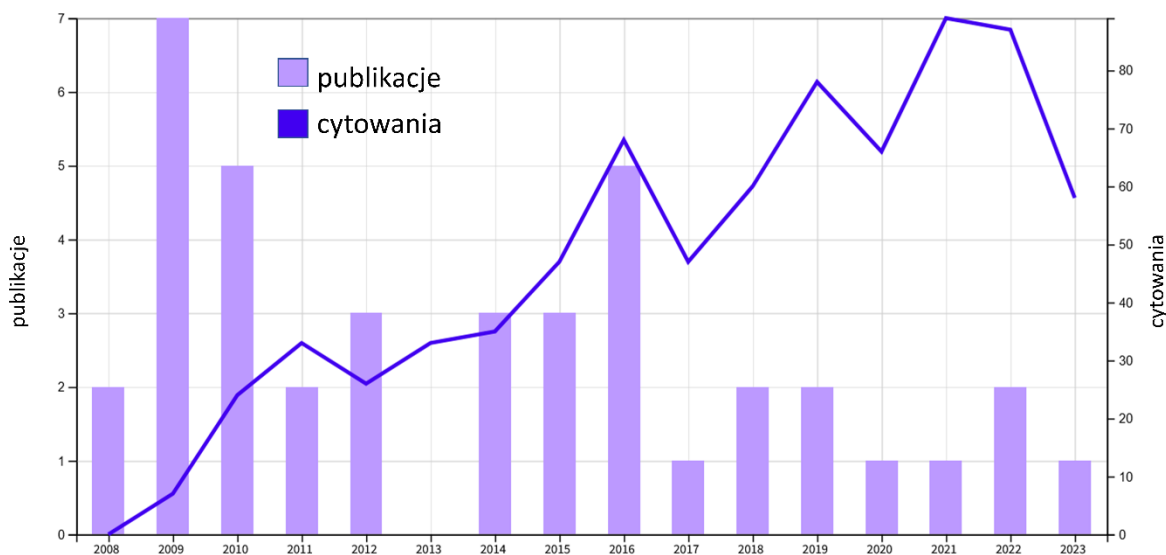
Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora miałem przyjemność zajmować się 16-członowym laktonowym antybiotykiem – josamycyną. W wyniku badań, w których brałem udział udało się po raz pierwszy otrzymać  $\alpha,\beta$ -nienasycony układ laktonowy dla tego typu antybiotyków oraz wyjaśnić mechanizm tego procesu (publikacja nr 9, Tabela 8). Brałem także udział w poszukiwaniu inhibitorów bakteryjnej podjednostki rybosomalnej 50S, tematyka ta była ściśle związana z projektem finansowany przez NCN w ramach konkursu „SONATA BIS” (byłem wykonawcą). Celem tego projektu było przeprowadzenie modyfikacji antybiotyków makrolidowych w obrębie makrocyklicznego układu laktonowego

zwanego aglikonem. W roku 2015 ukazała się praca w *Journal of Organic Chemistry*, w której został opisany proces modyfikacji aglikonu spiramycyny na drodze regio- i stereoselektywnych reakcji kaskadowych: dwóch reakcji typu E1cB prowadzących do uzyskania  $\alpha,\beta,\delta,\gamma$ -dienasyconego aglikonu spiramycyny oraz reakcji addycji typu 1,2 i następczej reakcji addycji typu 1,6 do układu nienasyconego laktonu. Powyższe przekształcenia doprowadziły do uzyskania nowego typu pochodnych spiramycyn (praca doktorska dr Katarzyny Klich – pełniłem rolę promotora pomocniczego) (publikacja nr 25, Tabela 8). W 2016 roku została opublikowana z kolei praca przedstawiająca regio- i stereoselektywną reakcję S<sub>N</sub>1' prowadzącą do otrzymania nowych pochodnych leukomycyn w pozycji C-13 w pierścieniu aglikonowym spiramycyn (praca doktorska dr Joanny Domagalskiej – pełniłem rolę promotora pomocniczego) (publikacja nr 26, Tabela 8). W kolejnych dwóch pracach zostały otrzymane serie nowych pochodnych, które są rozwinięciem poprzednich prac. Przeprowadzone badania aktywności biologicznej wykazały po raz pierwszy, że dla tego typu związków pojawia się interesująca aktywność przeciwnowotworowa (publikacje nr 28 i 29, Tabela 8).

Z kolei w ramach projektu OPUS 10, w którym byłem wykonawcą tematyka badawcza obejmowała badania nad półsyntetycznymi antybiotykami makrolidowymi. W wyniku realizacji tego projektu udało się wykazać, że chemia tych antybiotyków jest niezwykle ciekawa i ma ona związek z reakcjami wewnątrzcząsteczkowymi. Kluczowym związkiem był nietypowy  $\beta$ -keto-keteno-acetal, który ma odwróconą konfigurację na atomie węgla C(13). Związek ten w wyniku kolejnych przekształceń można otworzyć otrzymując ketolid, który jest epimerem związku pośredniego. W warunkach zasadowych natomiast można otrzymać mieszaninę dwóch izomerów posiadających nienasycony układ sprzężony z ugrupowaniem ketonowym w pozycji C(3) (publikacja nr 38, Tabela 8).

Innym niezwykle ciekawym projektem, w którym brałem udział był związany z modyfikacjami benzochinonowej ansamycyny – geldanamycyny (OPUS 13 – byłem wykonawcą). W wyniku prac badawczych w tym projekcie udało się uzyskać nowy typ pochodnych dla tej grupy związków. W trakcie kaskadowej reakcji rdzeń benzochinonowy aminowych pochodnych ansamycyn został przekształcony w układ benzoooksazolowy. Przekształcenia tego typu dają możliwości dalszych modyfikacji i mają interesujący wpływ na aktywność przeciwnowotworową (publikacja nr 40, Tabela 8).

Do tej pory jestem współautorem 40 publikacji naukowych z listy JCR (Tabela 8), z czego 8 publikacji [H1-H8] stanowi osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego. Jestem pierwszym oraz/lub autorem korespondencyjnym w 12 z 40 publikacji. Sumaryczna ilość 758 cytowań (673 bez autocytowań) daje indeks Hirsha równy 13 – źródło danych: Web of Science (Rysunek 15)



Rysunek 15 Dorobek naukowy i cytowani na rok. Źródło danych: Web of Science.

Tabela 8 Lista publikacji przed i po uzyskaniu stopnia doktora. Wszystkie czasopisma znajdują się w bazie JCR. Dane naukometryczne dla IF<sub>5-letni</sub> pobrane za rok 2022, dla dwóch publikacji rok ostatniej znanej wartości podano w nawiasie.

przed uzyskaniem stopnia doktora		
publikacja	IF <sub>rok wydania</sub>	IF <sub>5letni</sub>
1. Przybylski, P., Pyta, K., Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A., Brzezinski, B., „X-ray, FT-IR, ESI MS and PM5 studies of Schiff base of gossypol with allylamine and its complexes with alkali metal cations and perchlorate anion” <i>Struct. Chem.</i> 19, (2008), 983-995 DOI: 10.1007/s11224-008-9385-9, <a href="#">link</a>	1,433	1,4
2. Przybylski, P., Pyta, K., Wicher, B., Gdaniec, M., Brzezinski, B., „Structure of a new Schiff base of gossypol with 1-(3-aminopropyl)-2-pyrrolidinone studied by the X-ray, FT-IR, NMR, ESI-MS and PM5 methods” <i>J. Mol. Struct.</i> 889, (2008), 332-343 DOI: 10.1016/j.molstruc.2008.02.028, <a href="#">link</a>	1,594	3,2
3. Przybylski, P., Huczynski, A., Pyta, K., Brzezinski, B., Bartl, F., „Biological properties of Schiff bases and azo derivatives of phenols” <i>Curr. Org. Chem.</i> 13, (2009), 124-148 DOI:10.2174/138527209787193774, <a href="#">link</a>	2,879	2,3
4. Przybylski, P., Pyta, K., Remlein-Starosta, D., Schroeder, G., Brzezinski, B., Bartl, F., „Antifungal activity of alkyl and heterocyclic aza-derivatives of gossypol as well as their complexes with NaClO <sub>4</sub> against <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lupini” <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 19, (2009), 1996-2000	2,650	2,6

DOI:10.1016/j.bmcl.2009.02.051, <a href="#">link</a>		
5. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Brzezinski, B., „Complexes of heterocyclic aza-derivatives of phytoalexin from cotton plant-gossypol with alkali metal cations and perchlorate anion studied by ESI mass spectrometric method in the positive and negative modes” <i>J. Mass. Spectrom.</i> 44, (2009), 838-846 DOI:10.1002/jms.1559, <a href="#">link</a>	3,411	2,0
6. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A., Brzezinski, B., „Structure of a New Schiff Base of Gossypol with Ethyl 4-Amino-1-piperidine Carboxylate in the Solid and in the Solution” <i>Polish J. Chem.</i> 83, (2009), 747-759	0,523	0,38 (2011)
7. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Brzezinski, B., „Fragmentation pathways of new aza derivatives of 16-membered macrolide antibiotic – analog of Josamycin investigated by ESI and FAB mass spectrometric methods” <i>J. Mass. Spectrom.</i> 44, (2009), 1395-1401 DOI:10.1002/jms.1612, <a href="#">link</a>	3,411	2,0
8. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Stefańska, J., Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A., Huczyński, A., Brzezinski, B., „Synthesis, crystal structures and antibacterial activity of Aza-derivatives of bissequiterpene from cotton plants - gossypol” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 44, (2009), 4393-4403 DOI:10.1016/j.ejmech.2009.05.032, <a href="#">link</a>	3,269	6,5
9. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Brzezinski, B., „Unexpected $\alpha,\beta$ -unsaturated products of reductive amination of the macrolide antibiotic josamycin” <i>Tetrahedron Lett.</i> 50, (2009), 6203-6207 DOI:10.1016/j.tetlet.2009.08.118, <a href="#">link</a>	2,660	1,8
10. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Schilf W., Kołodziej B., Szady-Chełmieniecka A., Grech E., Brzezinski B., „Spectroscopic and theoretical studies of the protonation of N-(5-nitrosalicylidene)-ethylamine” <i>J Mol Struct.</i> 967, (2010), 140-146 DOI:10.1016/j.molstruc.2010.01.002, <a href="#">link</a>	1,599	3,2
11. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Huczyński A., Hoser A., Woźniak K., Schilf W., Kamieński B., Grech E., Brzezinski B. „X-ray, spectroscopic and computational studies of the tautomeric structure of a new hydrazone of 5-nitrosalicylaldehyde with indole-3-acetic hydrazide” <i>J Mol Struct.</i> 970, (2010), 147-154 DOI:10.1016/j.molstruc.2010.02.068, <a href="#">link</a>	1,599	3,2
12. Przybylski, P., <b>Pyta, K.</b> , Stefańska, J., Brzezinska, B., Bartl, F. „Structure elucidation, complete NMR assignment and PM5 theoretical studies of new hydroxy-aminoalkyl- $\alpha,\beta$ -unsaturated derivatives of the macrolide antibiotic josamycin” <i>Magn. Reson. Chem.</i> 48, (2010), 286-296 DOI:10.1002/mrc.2574, <a href="#">link</a>	1,247	1,8
13. Przybylski P., Kwit M., <b>Pyta K.</b> , Pankiewicz R., Schroeder G., Gawroński J., Brzezinski B., „Structure and atropoisomerisation of diastereoisomeric gossypol Schiff base with (R)-(+)-2-Amino-3-benzyloxy-1-propanol” <i>Tetrahedron:Asymmetry</i> 21, (2010), 973-981 DOI:10.1016/j.tetasy.2010.05.034, <a href="#">link</a>	2,484	1,858 (2016)
14. Przybylski P., <b>Pyta K.</b> , Czupryniak J., Wichera B., Gdaniec M., Ossowski T., Brzezinski B., „The influence of protonation on molecular structure and physico-chemical properties of gossypol Schiff bases” <i>Org. Biomol. Chem.</i> 8 (24), (2010), 5511-5518 DOI:10.1039/c0ob00288g, <a href="#">link</a>	3,451	3,0
15. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., „MALDI-TOF tandem mass spectrometric analysis of novel aza-analogues of semi-synthetic ansamycin antibiotic – rifampicin” <i>J. Mass. Spectrom.</i> 46, (2011), 751-756 DOI:10.1002/jms.1954, <a href="#">link</a>	3,268	2,0



16. Przybylski P., <b>Pyta K.</b> , „Transformation of josamycin in alkaline solution - Intramolecular S <sub>N</sub> 2 substitution or E1cB elimination and intramolecular Michael addition?” <i>Tetrahedron Letters</i> 52 (47), (2011), 6275-6280 DOI:10.1016/j.tetlet.2011.09.086, <a href="#">link</a>	2,683	1,8
17. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Wicher B., Gdaniec M., Stefańska J., „Intramolecular proton transfer impact on antibacterial properties of ansamycin antibiotic rifampicin and its new amino analogues” <i>Org. Biomol. Chem.</i> 8, (2012), 2385-2388 DOI:10.1039/c2ob00008c, <a href="#">link</a>	3,568	3,0
18. Wicher B., <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Tykarska E., Gdaniec M. „Redetermination of rifampicin penta-hydrate revealing a zwitterionic form of the anti-biotic” <i>Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications</i> , 68 (5), (2012), o209-o212. DOI:10.1107/S0108270112015296, <a href="#">link</a>	0,492	0,7
<b>Sumarycznie przed doktoratem</b>	<b>42,221</b>	<b>42,738</b>
<b>Średnia /publikację</b>	<b>2,346</b>	<b>2,374</b>
<b>po uzyskaniem stopnia doktora</b>		
<b>publikacja</b>	<b>IF<sub>rok wydania</sub></b>	<b>IF<sub>5letni</sub></b>
19. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Klich K., Stefańska J., „A new model of binding of rifampicin and its amino analogues as zwitterions to bacterial RNA polymerase” <i>Org. Biomol. Chem.</i> 10, (2012), 8283-8297 DOI:10.1039/c2ob26317c, <a href="#">link</a>	3,568	3,0
20. Przybylski P., <b>Pyta K.</b> , Klich K., Schilf W., Kamiński B., „ <sup>13</sup> C and <sup>15</sup> N CP/MAS, <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N SCT CP/MAS and FTIR spectroscopy as tools for qualitative detection of the presence of zwitterionic and nonionic forms of ansa-macrolide 3-formylrifamycin SV and its derivatives in solid state” <i>Magn. Reson. Chem.</i> 52 (1-2), (2014), 10-21, [H2] DOI:10.1002/mrc.4028, <a href="#">link</a>	1,179	1,8
21. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Klich K., Schilf W., Kamiński B., Grech E., Kołodziej B., Szady-Chelminiecka A., Brzezinski B., „Impact of metal cation complexation and protonation on tautomeric and resonance forms of the oxalkyl Schiff bases derived from 5-substituted salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthaldehyde” <i>Struct. Chem.</i> 25 (6), (2014), 1733-1746 DOI:10.1007/s11224-014-0447-x, <a href="#">link</a>	1,837	1,4
22. <b>Pyta K.</b> , Klich K., Domagalska J., Przybylski P., „Structure and evaluation of antibacterial and antitubercular properties of new basic and heterocyclic 3-formylrifamycin SV derivatives obtained via 'click chemistry' approach” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 84, (2014), 651-676, [H3] DOI:10.1016/j.ejmech.2014.07.066, <a href="#">link</a>	3,447	6,5
23. <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Bartl F., „Regioselective long-range proton transfer in new rifamycin antibiotics: A process in which crown ethers act as stronger brønsted bases than amines” <i>ChemPhysChem</i> , 16 (5), (2015), 938-942, [H6] DOI:10.1002/cphc.201402892, <a href="#">link</a>	3,138	3,0
24. Przybylski P., <b>Pyta K.</b> , Czerwonka D., Kubicka M.M., Gajecka M., „The effect of complexation of 3-formylrifamycin SV macrocyclic ether derivatives with metal cations and small nitrogen-containing organic molecules on antibacterial activity against <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> ” <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 25 (18), (2015), 3903-3909, [H7] DOI:10.1016/j.bmcl.2015.07.043, <a href="#">link</a>	2,486	2,6

25. Klich K., <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., „Regio- and Stereoselective Functionalization of 16-Membered Lactone Aglycone of Spiramycin via Cascade Strategy” <i>J. Org. Chem.</i> 80 (14), (2015), 7040-7049 DOI:10.1021/acs.joc.5b00847, <a href="#">link</a>	4,785	3,4
26. Domagalska J., <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., „Conversion of leucomycin-A3 antibiotic into novel triazole analogues via regio- and diastereoselective SN1' substitution with allylic rearrangement and 1,3-dipolar cycloaddition of CuAAC type” <i>Tetrahedron Lett.</i> 57 (15), (2016), 1661-1666 DOI:10.1016/j.tetlet.2016.02.113, <a href="#">link</a>	2,193	1,8
27. Czerwonka D., Domagalska J., <b>Pyta K.</b> , Kubicka M.M., Pecyna P., Gajecka M., Przybylski P., „Structure-activity relationship studies of new rifamycins containing l-amino acid esters as inhibitors of bacterial RNA polymerases” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , 116, (2016), 216-22, [H4] DOI:10.1016/j.ejmech.2016.03.061, <a href="#">link</a>	4,519	6,5
28. Klich K., <b>Pyta K.</b> , Kubicka M.M., Ruszkowski P. Celewicz L. Gajecka M. Przybylski P., „Synthesis, Antibacterial, and Anticancer Evaluation of Novel Spiramycin-Like Conjugates Containing C(5) Triazole Arm” <i>J. Med. Chem.</i> , 59 (17), (2016), 7963-7973 DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b00764, <a href="#">link</a>	5,589	7,3
29. Domagalska J., Janas A., <b>Pyta K.</b> , Pecyna P., Ruszkowski P., Celewicz L., Gajecka M., Bartl F., Przybylski P. „16-Membered Macrolide Lactone Derivatives Bearing a Triazole-Functionalized Arm at the Aglycone C13 Position as Antibacterial and Anticancer Agents” <i>ChemMedChem</i> , (2016), 1886-1891 DOI:10.1002/cmdc.201600250, <a href="#">link</a>	3,225	3,3
30. <b>Pyta K.</b> , Blecha M., Janas A., Klich K., Pecyna P., Gajecka M., Przybylski P., „Synthesis, structure and antimicrobial evaluation of a new gossypol triazole conjugates functionalized with aliphatic chains and benzyloxy groups” <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 26 (17), (2016), 4322-4326, [H1] DOI:10.1016/j.bmcl.2016.07.033, <a href="#">link</a>	2,454	2,6
31. Rogalski S., Zak P., Tadeuszyk N., <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Pietraszuk C., „The mechanism of activation of amidobenzylidene ruthenium chelates-latent catalysts of olefin metathesis” <i>Dalton Transactions</i> , 46 (4), (2017), 1277-1282 DOI:10.1039/c6dt04290b, <a href="#">link</a>	4,099	3,7
32. Wicher B., <b>Pyta K.</b> , Przybylski P., Gdaniec M., „Solvates of zwitterionic rifampicin: recurring packing motifs via nonspecific interactions” <i>Cryst. Growth Des.</i> , 18 (2), (2018), 742-754 DOI:10.1021/acs.cgd.7b01121, <a href="#">link</a>	4,153	3,6
33. Przybylski P., Pyta-Klich K., <b>Pyta K.</b> , Janas A., „Cascade reactions as efficient and universal tools for construction and modification of 6-, 5-, 4- and 3-membered sulfur heterocycles of biological relevance” <i>Tetrahedron</i> , 74(44), (2018), 6335-6365 DOI:10.1016/j.tet.2018.09.022, <a href="#">link</a>	2,379	1,9
34. <b>Pyta K.</b> , Janas A., Szukowska M., Pecyn P., Jaworska M., Gajecka M., Bartl F., Przybylski P., „Synthesis, docking and antibacterial studies of more potent amine and hydrazone rifamycin congeners than rifampicin” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , 167, (2019), 96-104, [H5] DOI:10.1016/j.ejmech.2019.02.009, <a href="#">link</a>	5,573	6,5
35. <b>Pyta K.</b> , Janas A., Skrzypczak N., Schilf W., Wicher B., Gdaniec M., Bartl F., Przybylski P., „Specific Interactions between Rifamycin Antibiotics and Water Influencing Ability To Overcome Natural Cell Barriers and the Range of Antibacterial Potency” <i>ACS Infectious Diseases Article</i> 5(10), (2019), 1754-1763	4,614	5,1

DOI:10.1021/acsinfecdis.9b00176, <a href="#">link</a>		
36. Skrzypczak N., <b>Pyta K.</b> , Ruszkowski P., Gdaniec M., Bartl F., Przybylski P., „Synthesis, structure and anticancer activity of new geldanamycin amine analogs containing C(17)- or C(20)- flexible and rigid arms as well as closed or open <i>ansa</i> -bridges” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , 202, (2020), Article 112624 DOI:10.1016/j.ejmech.2020.112624, <a href="#">link</a>	6,514	6,5
37. Skrzypczak N., <b>Pyta K.</b> , Ruszkowski P., Mikołajczak P., Kucińska M., Murias M., Gdaniec M., Bartl F., Przybylski P., „ Anticancer activity and toxicity of new quaternary ammonium geldanamycin derivative salts and their mixtures with potentiators” <i>J. Enz. Inhibit. Med. Chem.</i> , 36, (2021), 1898-1904 DOI:10.1080/14756366.2021.1960829, <a href="#">link</a>	5,756	5,2
38. Janas A., <b>Pyta K.</b> , Gdaniec M., Przybylski P., „ An Approach to Modify 14-Membered Lactone Macrolide Antibiotic Scaffolds” <i>J. Org. Chem.</i> , 87, (2022), 3758-3761 DOI:10.1021/acs.joc.1c02799, <a href="#">link</a>	3,6	3,4
39. <b>Pyta K.</b> , Skrzypczak N., Ruszkowski P., Bartl F., Przybylski P., „Regioselective approach to colchicine tropolone ring functionalization at C(9) and C(10) yielding new anticancer hybrid derivatives containing heterocyclic structural motifs” <i>J. Enz. Inhibit. Med. Chem.</i> , 37, (2022), 597-605 DOI:10.1080/14756366.2022.2028782, <a href="#">link</a>	5,6	5,2
40. Skrzypczak N., <b>Pyta K.</b> , Bohusza W., Leśniewska A., Gdaniec M., Ruszkowski P., Schilf W., Bartl F., Przybylski P., „Cascade transformation of the ansamycin benzoquinone core into benzoxazole influencing anticancer activity and selectivity” <i>J. Org. Chem.</i> , 87, (2023), DOI: 10.1021/acs.joc.3c00493 DOI:10.1021/acs.joc.3c00493, <a href="#">link</a>	3,6	3,4
<b>Sumarycznie po doktoracie</b>	<b>84,308</b>	<b>87,7</b>
<b>Średnia/publikację</b>	<b>3,803</b>	<b>3,955</b>

**Sumarycznie 126,529 130,438**

**Średnia sumaryczna 3,163 3,261**

## 7.2 Granty i projekty naukowe

### Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

1. „IUVENTUS PLUS” finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, numer grantu: 0366/IP3/2013/72, tytuł grantu: „Projektowanie i synteza nowej klasy triazolowych pochodnych gossypolu, jako efektywnych fungicydów, z zastosowaniem chemii click”, okres realizacji: w latach 2013-2015, kwota dofinansowania: 227 650 PLN, **KIEROWNIK**.
2. „Miniatura” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, numer grantu: , tytuł grantu: „Badanie reaktywności modyfikowanego aglikonu 14-członowych makrolidów laktonowych”, okres realizacji od 5.10.2023 roku , kwota dofinansowania: 49 991 PLN, **KIEROWNIK**.

3. „SONATA BIS 1” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, numer grantu: 2012/05/E/ST5/03792, tytuł grantu: „Modyfikacje aglikonu leukomycyn przez addycję Michaela i dipolarną cykloaddycję Huisgena jako nowe drogi otrzymania inhibitorów podjednostki rybosomalnej 50S”, okres realizacji: w latach 2013-2016, kwota dofinansowania: 986 800 PLN , **WYKONAWCA**.
4. „OPUS 3” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, numer grantu: 2011/03/B/ST5/01014 tytuł grantu: „Projektowanie i synteza nowych analogów rifampicyny jako źródło efektywnych inhibitorów bakteryjnej polimerazy RNA”, okres realizacji: w latach 2012-2015, kwota dofinansowania: 615 000 PLN, **GLÓWNY WYKONAWCA**.
5. „OPUS 10” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, MUMER GRANTU: UMO-2015/19/B/ST5/00231, TYTUŁ GRANTU: „Funkcjonalizacja 14-członowego pierścienia laktonowego Erytromycyn jako nowe źródło półsyntetycznych antybiotyków makrolidowych”, okres realizacji: w latach 2016-2020, kwota dofinansowania: 745 500 PLN, **WYKONAWCA**.
6. OPUS 13 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, numer grantu: UMO-2017/25/B/ST5/00291 tytuł grantu: „Chemiczne modyfikacje makrocyklicznego poliketydu -geldanamycyny otwierające dostęp do nowych alternatywnych środków przeciwnowotworowych blokujących aktywność białek chaperonowych Hsp90”, okres realizacji: w latach 2018-2021, kwota dofinansowania: 1 175 000 PLN, **WYKONAWCA**.

(potwierdzenia przyznania, prowadzenia, udziału w projekcie w załączniku nr 8)

### 7.3 Nagrody i wyróżnienia

<p><b>przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2011 Laureat stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „START – Stypendium dla młodych utalentowanych naukowców”</li> <li>2. 2011 Stypendysta Fundacji im. Adama Mickiewicza</li> <li>3. 2012 Stypendysta Miasta Poznania</li> </ol>
<p><b>po uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>2020</b> Nagroda II klasy Rektora UAM</li> </ol>

### 7.4 Plany na przyszłość

W związku z tym, że zostałem laureatem programu „Miniatura edycja 7” (potwierdzenie w załączniku nr 8) moja uwaga w najbliższym czasie będzie skupiona na 14-członowych antybiotykach makrolidowych. Głównym założeniem tego projektu jest zbadanie

reaktywności związków, które zostały otrzymane i opisane w pracy (Janas A., **Pyta K.**, Gdaniec M., Przybylski P., „ An Approach to Modify 14-Membered Lactone Macrolide Antibiotic Scaffolds” *J. Org. Chem.*, 87, (2022), 3758-3761, DOI:10.1021/acs.joc.1c02799, [link](#)). Zsyntezowane związki mogą okazać się prekursorami kolejnej generacji antybiotyków z grupy 14-członowych makrolidów i z tego powodu zostaną przebadane pod kątem aktywności biologicznej – badania przeciwbakteryjne oraz przeciwnowotworowe. Natomiast samo ustalenie reaktywności zmodyfikowanego aglikonu umożliwi precyzyjnie zaplanować typ oczekiwanych pochodnych o określonym profilu aktywności biologicznej. W rezultacie wyniki tych badań umożliwią w racjonalny sposób zaplanować typ podstawnika wprowadzonego do części aglikonowej antybiotyków makrolidowych, tak aby zmaksymalizować efekt biologiczny (aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową).

Biorąc pod uwagę doświadczenie zdobyte w tematyce antybiotyków ansamycynowych, będę chciał wykorzystać tę wiedzę do zaprojektowania i otrzymania nowej klasy ansamycyn o szerokim spektrum aktywności (szczególnie w kierunku bakterii Gram-ujemnym). W tym miejscu pragnę zaznaczyć, że udowodnienie labilności konformacyjnej mostu ansamycynowego rifamycyn w roztworach zawierających cząsteczki wody (**RFB** i **RFX**) rzuca nowe światło na proces transportu tych antybiotyków przez błony komórkowe i ściany komórkowe bakterii. Bazując na tych obserwacjach można skuteczniej planować struktury tych antybiotyków tak, żeby jak najbardziej uwypuklać elementy strukturalne wpływające na wysoką aktywność przeciwbakteryjną oraz poprawiać proces migracji przez bariery biologiczne tych antybiotyków.

To, co jednak zainspirowało mnie najbardziej w dotychczasowej przygodzie z nauką dotyczy szeroko rozumianych reakcji wewnątrzcząsteczkowych, które napędzają fascynujące procesy transformacji (z mojego doświadczenia: 14- i 16-członowe makrolidy i ich reakcje oraz tworzenie układów heterocyklicznych ansamycyn: benzooksazolowego dla aminowych pochodnych geldanamycyny i układ benzochinazolinowy dla aminowych pochodnych **Ral**). Chciałbym w przyszłości rozwijać i sprawdzać reaktywność układów tego typu i podobnych, w celu nie tylko rozwijania chemii, ale przede wszystkim w kierunku poszukiwania nowych związków bioaktywnych.

.....

(podpis wnioskodawcy)