



Prof. dr hab. Jacek W. Morzycki

ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok ☎ (85) 738 82 60, fax: (85) 738 80 52, e-mail: morzycki@uwb.edu.pl

Białystok, 15.03.2021 r.

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Dominiki Janas

„Synteza i ustalenie korelacji struktura-aktywność biologiczna nowych pochodnych 14- i 15-członowych antybiotyków makrolidowych zawierających przebudowane ramiona sacharydowe”

Praca doktorska mgr Anny Dominiki Janas została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Przybylskiego i dra Krystiana Pyty (promotor pomocniczy) w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Mgr Janas jest współautorką sześciu publikacji źródłowych w bardzo dobrych czasopismach z zakresu chemii medycznej (dwie w Eur. J. Med. Chem., dwie w ChemMedChem i po jednej w ACS Infect. Dis. i Bioorg. Med. Chem. Lett.) oraz pracy przeglądowej opublikowanej w Tetrahedron. Pomimo tych niewątpliwych osiągnięć doktorantka zdecydowała się na przedstawienie swojej dysertacji w formie klasycznej, co było bardzo dobrą decyzją, gdyż dzięki takiej formie recenzentowi łatwiej jest ocenić dokonania doktorantki. Rozprawa doktorska mgr Anny Dominiki Janas liczy w sumie 422 ponumerowane strony, w tym 81 stron stanowią kopie wykonanych widm NMR i IR a 65 stron zajmują tabele z przesunięciami chemicznymi w widmach  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR (w przypadku widm  $^1\text{H}$  NMR podane zostały również stałe sprzężenia). Do pracy dołączono trzy załączniki ze wzorami otrzymanych związków. Praca posiada dość obszerny (73 strony), ale bardzo potrzebny, wstęp teoretyczny, w którym doktorantka przedstawiła chemię antybiotyków makrolidowych, w szczególności makrolidów 14-członowych takich jak erytromycyna i jej eter klarytromycyna oraz 15-członowej azytromycyny, którymi zajmowała się w swojej pracy. Bardzo dokładnie zostały opisane rozliczne modyfikacje tych związków i zależność aktywności biologicznej od struktury. Jednym z największych problemów współczesnej medycyny jest rozwijająca się oporność bakterii na antybiotyki. Wynika stąd konieczność ich modyfikacji chemicznej. Doktorantka wprowadzała zmiany strukturalne w oparciu o dipolarną cykloaddycję Huisgena oraz reakcje czwartorzędowania amin, którym zostały poświęcone oddzielne rozdziały we wstępie. Reakcje czwartorzędowania amin były badane przez Menshutkina w XIX wieku. Badacz ten zmarł w 1907 r. – nie mógł więc opisać wyników swoich badań w 1980 r. (zapewne powinno być „w 1890 r.”). Dokładnie też zostały omówione ciekawe przekształcenia soli amoniowych, chociaż nie były one przedmiotem badań doktorantki. Drobne i nieliczne błędy jak np. „pierścień cykliczny” (str. 70) (jest to pleonazm podobnie jak

„masło maślane”) czy odwrócenie na Schemacie 14 alternatywnych mechanizmów (para jonowa vs. para rodników) nie mają wpływu na moją wysoką ocenę wstępu teoretycznego do pracy.

Do naturalnych antybiotyków makrolidowych o 14-członowym pierścieniu należą m. in. erytromycyny. Posiadają one dwa podstawniki cukrowe: L-kladynozę przy atomie C3 i D-dezozaminę przy C6. W wyniku opisanych w literaturze przekształceń erytromycyny A otrzymana została azytromycyna (AZM) zawierająca atom azotu w 15-członowym pierścieniu makrolidowym. Jest to antybiotyk drugiej generacji o szerszym spektrum działania i większej stabilności od produktu naturalnego. Doktorantka w pierwszym etapie przeprowadziła kwaśną hydrolizę azytromycyny, która zgodnie z doniesieniami literaturowymi zachodziła regioselektywnie. Usunięty został cukier L-kladynoza i została otrzymana 3-OH-azytromycyna (AZM-OH). Chociaż związek ten jest znany, doktorantka przeprowadziła jego szczegółową (17 stron) analizę widmową ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR) z wykorzystaniem technik dwuwymiarowych  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY, które umożliwiły pełne przypisanie sygnałów w widmach. Otrzymane dane dla tego związku, podobnie jak dla otrzymanych później jego pochodnych, zostały umieszczone w odpowiednich tabelach na końcu rozdziału Wyniki i dyskusja. W następnym etapie doktorantka przeprowadziła estryfikację grupy C2'-hydroksylowej dezozaminy chloromrówczanem propargilu. Pomimo obecności w substracie pięciu wolnych grup hydroksylowych reakcja zachodziła regioselektywnie na C2', ponieważ atom tlenu tej grupy ma zwiększoną gęstość elektronową z powodu sąsiadującej grupy aminowej. Otrzymana pochodna AZM-1 zawierająca wiązanie potrójne posłużyła jako platforma do syntezy dalszych pochodnych na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena z różnymi azydkami. Doktorantka otrzymała w ten sposób, śledząc postęp reakcji za pomocą HPLC, serię 20-u stabilnych pochodnych antybiotyku, wśród nich związki z podstawnikiem alicyklicznym, aromatycznym lub cukrowym na końcu łańcucha. Wszystkie te związki zostały w pełni scharakteryzowane wraz z analizą konformacyjną łańcucha na podstawie analizy widm NOESY. Wykazały one, że związki występują w konformacji korzystnej w kontekście wymogów sterycznych tunelu rybosomalnego, gdzie zachodzi odwracalne wiązanie antybiotyków makrolidowych, które powoduje inhibicję syntezy białek bakteryjnych. Wśród substratów azydkowych użytych do cykloaddycji Huisgena szczególnie interesujące wydają się pochodne cytotoksycznej kolchiceiny. Związek ten ulega tautomeryzacji w obrębie pierścienia tropolonowego. Z tego powodu jego eteryfikacja tosyłanem 3-azydopropylu prowadziła do powstania dwóch izomerycznych produktów w zbliżonych ilościach. Zostały one rozdzielone i poddane reakcji z AZM-1. Innym kierunkiem badań doktorantki było czwartorzędowanie grupy *N,N*-dimetyloaminowej w dezozaminie. Taka modyfikacja nie została dotąd opisana w literaturze, a można było przypuszczać, że uzyskane w ten sposób wysoce hydrofilowe sole amoniowe będą ułatwiać transport antybiotyku do miejsca docelowego. Reakcje *N*-alkilowania doktorantka prowadziła na trzech substratach: AZM, AZM-1 i azytromycynie podstawionej grupą acetylową na C2'. Ten ostatni związek udało się łatwo otrzymać, gdyż acetylowanie azytromycyny zachodzi selektywnie właśnie w tej pozycji. W reakcjach *N*-alkilowania stosowano różne bromki alkilowe (allilowe, benzylowe, propargilowe, z grupami estrowymi,

amidowymi, itp). Ze względu na obecność w azytromycynie dwóch aminowych atomów azotu (w aglikonie i dezozaminie), które potencjalnie mogły ulegać alkilowaniu, proces należało przeprowadzić w sposób kontrolowany (niewielki nadmiar bromku w acetonitrylu, temperatura pokojowa, kontrola HPLC). Stosując taką metodologię doktorantka otrzymała 24 sole amoniowe. W celu potwierdzenia miejsca przyłączenia (przy dezozaminowym atomie azotu) podstawnika alkilowego przeprowadzona została szczegółowa analiza widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Kolejnych 6 soli amoniowych zostało otrzymanych z innego substratu – klarytromycyny. Ten 14-członowy makrolid jest eterową pochodną erytromycyny (6-*O*-metyloerytromycyna A) i zawiera atom azotu tylko we fragmencie sacharydowym, czyli nie było w tym przypadku problemu regioselektywności. Klarytromycyna była też stosowana przez doktorantkę w dalszych badaniach, których celem była modyfikacja 14-członowego aglikonu polegająca na wprowadzeniu mostka karbaminianowego przy C11 i C12. Pierwszym etapem w zaplanowanej syntezie była eliminacja grupy hydroksylowej przy C11. Został on skutecznie zrealizowany przez zastosowanie węgla etylenu we wrzącej trietyloaminie. Tworzący się początkowo węgiel makrolidu ulegał dalszym przemianom dając ostatecznie produkt dehydratacji –  $\alpha,\beta$ -nienasycony keton CLA-7. Związek ten poddano następnie kwaśnej hydrolizie mającej na celu usunięcie jednego podstawnika sacharydowego, konkretnie kładynozy. Selektywna acetylacja pozwoliła zabezpieczyć dezozaminową grupę hydroksylową w otrzymanym produkcie przed utlenianiem. Z kolei drugorzędowa grupa hydroksylowa w aglikonie została utleniona metodą Kima-Coreya do ketonu CLA-10. Związek ten posiadający wolną trzeciorzędową grupę hydroksylową w pozycji C12 ulegał przekształceniu z CDI (1,1'-karbonyldiimidazol) do pochodnej karboimidazolowej. Doktorantka miała nadzieję, że ta pochodna będzie reagować z różnymi pierwszorzędowymi aminami z utworzeniem cyklicznego karbaminianu. Wiele takich reakcji zostało wcześniej opisanych w literaturze. Okazało się jednak, że reakcja z alliloaminą zachodzi w nieoczekiwany sposób. Otrzymany mało polarny produkt CLA-14 wykazywał w widmie MS identyczną wartość  $m/z$  dla jonu  $\text{MH}^+$  jak w przypadku CLA-10, czyli wydawał się być jego izomerem. Szczegółowa analiza widmowa doprowadziła doktorantkę do wniosku, że powstały związek jest „zamrożoną” formą enolową CLA-10, przy czym enolizacji uległa estrowa grupa karbonylowa w  $\beta$ -ketoestrze stanowiącym fragment 14-członowego pierścienia makrolidowego. Taka interpretacja, chociaż zgodna z symulacją widma  $^{13}\text{C}$  NMR, kłóci się z moją intuicją chemiczną. Moim zdaniem, zaproponowana struktura może co najwyżej służyć jako robocza hipoteza, która wymaga potwierdzenia zarówno teoretycznego jak i doświadczalnego. W pracy podana jest struktura CLA-14 obliczona metodą DFT (Rys. 188). Doktorantka powinna porównać energię optymalnej konformacji tego związku z energią obliczoną dla CLA-10. Ponieważ CLA-14 został otrzymany w wysokiej temperaturze (produkt termodynamiczny), obliczenia powinny wykazać jego niższą energię. Niezbędne wydają się również próby izomeryzacji CLA-10 i CLA-14 w podwyższonej temperaturze (może być znaczna bariera aktywacji). Wydaje mi się jednak, że należy szukać alternatywy dla zaproponowanej struktury, np. czy byłby możliwy atak nukleofilowy trzeciorzędowego alkoholanu, jaki tworzy się w trakcie reakcji, na estrową grupę karbonylową (transestryfikacja)? Taki proces prowadziłby do

kontrakcji pierścienia makrolidowego a w łańcuchu bocznym znalazłaby się drugorzędowa grupa hydroksylowa. Produktem byłby  $\beta$ -ketoester zlokalizowany w pierścieniu 13-członowym, który mógłby enolizować, ale sugerowałbym raczej enolizację ketonowej grupy karbonylowej. Wydaje mi się, że zaobserwowane przekształcenie wymaga dalszych badań. Ponieważ założony przez doktorantkę plan syntezy cyklicznych karbaminianów zakończył się niepowodzeniem, podjęła Ona próby otrzymania nowych pochodnych klarytromycyny na innej drodze. Postanowiła otrzymać połączenia hybrydowe tego związku z kolchiceiną. Podejście syntetyczne do tych połączeń było identyczne do tego opracowanego wcześniej dla azytromycyny. W wyjściowym związku CLA-10 odbezpieczona została grupa 2'-hydroksylowa w cukrze, a następnie przeprowadzono jej acylowanie chloromrówczanem propargilu. Otrzymana pochodna została użyta do 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena z przygotowaną wcześniej azydkową pochodną kolchiceiny. Uzyskane w ten sposób połączenie hybrydowe zostało w pełni scharakteryzowane spektralnie, w tym za pomocą widma NOESY, które nie wykazało żadnych kontaktów między połączonymi antybiotykami.

Integralną częścią pracy doktorskiej mgr Janas stanowią wyniki badań biologicznych otrzymanych połączeń na aktywność przeciwbakteryjną. Niestety otrzymane pochodne azytromycyny zmodyfikowane w pozycji C2', jak też sole amoniowe nie wykazywały znaczącej aktywności względem wybranych szczepów bakteryjnych. Lepiej na tym tle wypadły *N*-alkilowe pochodne zawierające 14-członowy aglikon. Pochodne klarytromycyny z nienasyconym i relatywnie małym podstawnikiem *N*-alkilowym wykazywały aktywność nieznacznie tylko niższą od referencyjnych antybiotyków. Otrzymane wyniki doktorantka starała się wyjaśnić w oparciu o sposób dokowania i energie wiązania otrzymanych pochodnych w tunelu rybosomalnym. W rozdziale pracy doktorskiej poświęconym analizie aktywności biologicznej zmodyfikowanych w części cukrowej antybiotyków makrolidowych zabrakło, z nieznanego powodu, danych o aktywności połączeń hybrydowych azytromycyny i klarytromycyny z kolchiceiną.

Wykonane przez doktorantkę eksperymenty zostały dokładnie opisane w Części eksperymentalnej, w sposób umożliwiający odtworzenie wszystkich opisywanych procedur. Jednak charakterystyka właściwości fizycznych otrzymanych związków jest niezadowalająca, gdyż brak jest temperatur topnienia i skręcalności właściwych. Przypuszczam, że w większości przypadków są to amorficzne ciała stałe, ale skręcalność najważniejszych produktów powinna być zmierzona. Wyniki analiz elementarnych są imponujące; takiej zgodności z wartościami obliczonymi nigdy nie udało mi się uzyskać.

Praca doktorska mgr Janas jest napisana poprawnym na ogół językiem i zawiera stosunkowo mało błędów. Nieliczne drobne błędy nie utrudniają czytania pracy. Niektóre z nich z obowiązku recenzenta przytaczam:

1. Doktorantka ma problem z biernikiem: „tą samą pozycję” (str. 81), „tą wartość” (str. 87), „tą metodę” (str. 296); powinno być: „tę samą pozycję”, „tę wartość”, „tę metodę”;
2. Niezręczne sformułowania: „wyjściowy substrat” (str. 152, 197), „jedynie jeden (str. 90)”. Nic nie mówiący tytuł „Synteza związków alkilowych” (str. 142) powinno się zamienić na „*N*-alkilowanie CLA”;

3. Str. 105 na dole: „bromek benzylu”; powinno być „związek p-cyjanobenzylu”;
4. Str. 118: do C2' przyłączony jest węglan a nie mrówczan;
5. Str. 129, Schemat 22: jeśli w produktach trzech reakcji mamy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> i R<sup>3</sup>, to nad strzałką powinno być tak samo;
6. Str. 152, Schemat 25: strzałkę z obustronnym grotem stosuje się tylko do struktur mezomerycznych;
7. Str. 171, Rys. 147: chyba widmo w trybie jonów dodatnich jest zamieszczone na dole (zamienione A i B).

Reasumując stwierdzam, że doktorantka wykazała się dobrą znajomością nowoczesnej chemii organicznej. Praca została zaprojektowana z pomysłem, a uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale potencjalnie mogą mieć także znaczenie praktyczne. Doktorantka jest współautorem siedmiu publikacji w bardzo dobrych czasopismach.

Jestem przekonany, że oceniana praca spełnia z nadmiarem ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Anny Dominiki Janas i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Jednocześnie proszę Wysoką Radę o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy. Doktorantka wykazała się wyjątkową pracowitością przy syntezie 50-u nowych pochodnych antybiotyków makrolidowych. Wszystkie one zostały drobiazgowo scharakteryzowane spektralnie z wykorzystaniem dwuwymiarowych technik NMR, co pozwoliło na pełne przypisanie sygnałów w ich widmach.

Marek Morzycki