

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Domagalskiej

pt.: „*Modyfikacja aglikonu Josamycyny z wykorzystaniem regioselektywnej substytucji nukleofilowej typu S_N1' i dipolarnej cykloaddycji Huisgena*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Domagalskiej powstała w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych na Wydziale Chemii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem dra. hab. Piotra Przybylskiego, prof. UAM – promotora oraz dra. Krystiana Pyty – promotora pomocniczego.

Praca dotyczy syntetycznej modyfikacji josamycyny - makrolidu o dość złożonej strukturze, zbudowanego z 16-członowego makrocyklicznego laktonu połączonego z disacharydem. Josamycyna wraz całą rodziną związków (leukomycyn) znana jest z szerokiego spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Jest też stosowana w leczeniu niektórych nowotworów w chemioterapii skojarzonej. Celem modyfikacji było uzyskanie nowych pochodnych o zwiększonej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej o lepszej tolerancji w stosunku do komórek zdrowych. Pod względem poruszanej problematyki dysertacja mocno osadzona jest w tematyce naukowej promotorów, którzy są ekspertami w/w dziedzinie.

Pani mgr Joanna Domagalska postawiła sobie ambitne zadanie, polegające na otrzymaniu szeregu pochodnych josamycyny poprzez wprowadzenie podstawnika propargiloksylogowego do aglikonu, a następnie na przekształceniu go w ugrupowanie z pierścieniem triazolowym, ustaleniu struktur otrzymanych związków, przeprowadzeniu badań biologicznych i w efekcie końcowym znalezieniu korelacji pomiędzy wprowadzonymi zmianami strukturalnymi, a odpowiedzią biologiczną. Na podstawie prac Tensona i współpracowników, którzy badali sposób wiązania leukomycyn z podjednostką 50S w obrębie tunelu rybosomalnego, Doktorantka zauważyła, że w kompleksie makrolidu z rybosomem występuje luka w pobliżu fragmentu dienowego. Podążając za tą obserwacją założyła, że wypełnienie tej luki może wpłynąć na stabilizację kompleksu a tym samym na zwiększenie aktywności biologicznej. Dlatego też celem prac syntetycznych było modyfikowanie właśnie tego fragmentu.

Na wstępie chciałbym nadmienić, że przy ocenie tego typu badań należy mieć świadomość, że z jednej strony podjęta tematyka jest niezwykle ważna z powodu obserwowanego ciągłego wzrostu oporności bakterii chorobotwórczych na stosowane antybiotyki, a także ze względu na plagę chorób nowotworowych, z drugiej strony natomiast jest niezwykle trudna, gdyż łączy aspekty chemii eksperymentalnej, strukturalnej, teoretycznej, medycznej, biochemii, biologii i innych dziedzin. Ponadto, w przypadku chemicznych transformacji związków z wieloma grupami funkcyjnymi planowane przemiany nie zawsze prowadzą do z góry planowanych produktów, równocześnie docelowa korelacja struktur z wynikami badań biologicznych zawsze narzuca potrzebę zsyntezowania dość obszernej biblioteki obiektów. W przypadku makrolidów, a szczególnie leukomycyn zawierających ugrupowanie disacharydowe, dodatkowym wyzwaniem jest przeprowadzenie pełnej analizy strukturalnej każdego otrzymanego związku. Po zapoznaniu się z dysertacją stwierdzam, że Pani mgr Joanna Domagalska sprostała wymaganiom, jakie narzuca podjęta problematyka i że cel pracy został w pełni osiągnięty.

Pod względem formalnym oceniana dysertacja ma układ klasyczny. Przedstawiona na 233 stronach składa się z „Części teoretycznej” (48 stron), z „Wyników i dyskusji” (100 stron), z „Części eksperymentalnej” (67 stron) i bibliografii (8 stron, 157 pozycji literaturowych). Początek pracy zaopatrzony jest w spis treści, wykaz stosowanych skrótów i symboli oraz w rozdział z dość krótkim wprowadzeniem i sformułowanymi celami pracy. Na końcu pracy znajduje się podsumowanie oraz streszczenie w języku angielskim. Dysertacja napisana jest w sposób zwięzły, poprawnym językiem. Na wyróżnienie zasługuje strona graficzna pracy, gdyż obfituje ona w wysokiej jakości kolorowe rysunki fragmentów widm, schematów reakcji czy modeli molekularnych. Rysunki są dobrze dobrane i umieszczone w odpowiednim miejscu, co znacznie ułatwia poruszanie się w trudnym materiale. Bardzo dobrym pomysłem jest dołączenie laminowanych, luźnych załączników ze strukturami otrzymanych związków, co również bardzo ułatwia śledzenie prezentowanych wywodów Autorki.

W części teoretycznej Doktorantka przedstawiła zwięzłe kompendium wiedzy na temat josamycyny, jej odkryciu, struktury, biosyntezy, ścieżek syntezy totalnej, mechanizmu aktywności biologicznej, klinicznej oporności oraz dotychczas przeprowadzonych modyfikacji. Ta część jest poprzedzona ogólnymi informacjami na temat makrolidów, ze szczególnym uwzględnieniem leukomycyn. Całość zawarta jest na 26 stronach. Na pozostałych 22 stronach części teoretycznej zostały omówione reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji prowadzące do triazoli, od historii do zastosowań w reakcjach typu „click”, oraz reakcje zachodzące w wyniku substytucji nukleofilowej. Taki wybór zagadnień bardzo dobrze koresponduje z tematem rozprawy doktorskiej i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w główne zagadnienia rozprawy. Mało istotnym wyjątkiem jest tu, moim zdaniem, niezbyt trafiony przykład syntezy wielofunkcyjnych piroolidyn, pokazany na rysunku 47, gdyż

reakcja ta katalizowana związkami palladu, mimo że daje produkt zgodny z regiochemią S_N2' , zachodzi według innego mechanizmu.

W części pt. „Wyniki i dyskusja” Pani mgr Joanna Domagalska opisała syntezę biblioteki 31 pochodnych josamycyny. Jednak nie ilość otrzymanych obiektów jest tu najważniejsza, chociaż przy tak skomplikowanych strukturach ilość ta również sprawia pozytywne wrażenie. Bardziej istotne są tu jednakże reakcje, jakie w wytworzeniu tych pochodnych zostały przeprowadzone. I tak, na początku Doktorantka opracowała warunki zmiany aglikonu josamycyny w jej pochodną ze sprzężonym ugrupowaniem laktonowym w wyniku eliminacji E1cB, powołując się na literaturową przesłankę, wskazującą na pozytywny wpływ tego ugrupowania na właściwości przeciwbakteryjne. Mimo możliwych reakcji konkurencyjnych Doktorantce udało się otrzymać ten związek z 95% wydajnością. W wyniku kolejnych transformacji Doktorantka stwierdziła, że w obecności kwasu p-toluenosulfonowego (PTSA) przy użyciu odpowiednich alkoholi selektywnemu wprowadzeniu różnych grup alkoksylowych w pozycję C-13 aglikonu towarzyszy przegrupowanie allilowe oraz że jednocześnie następuje acetalizacja grupy aldehydowej i usunięcie terminalnej grupy cukrowej. Ponieważ próby selektywnego odblokowania grupy aldehydowej nie powiodły się – co uniemożliwiało przeprowadzenie planowanej reakcji cykloaddycji –, i nie powiodła się także zamiana kolejności reakcji oraz zastosowanie acetylowej pochodnej wyjściowego związku, dlatego Doktorantka postanowiła użyć wyjściowego układu ze zredukowaną grupą aldehydową. Ten nowy układ macierzysty otrzymała w wyniku redukcji grupy aldehydowej w josamycynie i eliminacji E1cB z utworzeniem nienasyconego laktonu. Układ ten pozwolił na wprowadzenie w pozycję C-13 różnych grup benzyloksylowych oraz dwóch grup z ugrupowaniem alkinowym, któremu – podobnie jak poprzednio – towarzyszyło przegrupowanie allilowe i odłączenie terminalnej grupy cukrowej. Pochodna z grupą C13-propargiloksylową, otrzymana z wydajnością 63% stała się substratem w reakcjach cykloaddycji z odpowiednimi azydami. W wyniku reakcji cykloaddycji Doktorantka otrzymała 14 pochodnych z pierścieniem triazolowym ze zróżnicowanymi strukturalnie podstawnikami, z wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 32-70%. Ten fragment badań jest bardzo ciekawy, dobrze pokazuje, jak trudno przewidzieć skutki planowanych reakcji oraz że natura układów makrocyclicznych nie do końca jest przewidywalna, a tym samym bardzo interesująca. Fragment ten pokazuje, że Doktorantka umie właściwie zaplanować eksperyment, potrafi wyciągnąć wnioski i że jest zdeterminowana w osiągnięciu zaplanowanego celu.

Wśród wielu ważnych i ciekawych aspektów pracy najbardziej wartościowe naukowo wydaje się badanie mechanizmu przegrupowania allilowego, przeprowadzonego na pochodnej J12 (drugiego układu macierzystego ze zredukowaną grupą aldehydową i sprzężonym fragmentem laktonowym, z grupą hydroksylową, znajdującą się w pozycji C-9), w reakcji z alkoholem propargilowym w

obecności PTSA. W tej przemianie w pozycję C-13 zostaje wprowadzony fragment propargiloksylowy z przesunięciem układu dienowego i usunięciem grupy OH z pozycji C-9. Utrudnieniem w badaniu mechanizmu był fakt odrywania się terminalnej jednostki cukrowej. Mimo tych trudności Doktorantce udało się wykazać przy pomocy chromatografii HPLC, że szybkość badanego przegrupowania nie zależy od stężenia odczynnika nukleofilowego, lecz od ilości użytego kwasu, co dowodzi występowania mechanizmu S_N1' . Doktorantka próbuje w dalszej części pracy wyjaśnić przyczynę całkowitej stereoselektywności reakcji, która rzadko występuje w przypadku karbokationów. Jednak pokazanie na rysunku 110 struktur rezonansowych, które mają wyjaśniać przyczyny regio- i stereoselektywności substytucji, nie do końca mnie przekonuje. Co prawda, obliczona gęstość elektronowa potwierdza największy deficyt elektronowy na atomie węgla C-13, co wskazuje, że jest to najkorzystniejsza struktura karbokationu (z czym trudno polemizować), to jednak przyglądając się strukturom rezonansowym na rysunku 111, nasuwa się pytanie, czy do takiej stabilizacji karbokationu nie może przyczynić się atom tlenu grupy karbonylowej laktamu. Przecież potencjalnie utworzony jon oksoniowy byłby 6-członowy, stanowiłby dalszą stabilizację rezonansową karbokationu. Co więcej, przy tak utworzonym jonie oksoniowym atak nukleofila może zachodzić tylko z jednej strony. Pozostawiam to jako głos w dyskusji do ewentualnego rozważenia przez Doktorantkę.

Wszystkim opisanym przemianom towarzyszy bardzo dobrze przeprowadzona analiza strukturalna otrzymanych związków, wykonana głównie przy pomocy widm jedno- i dwuwymiarowych NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), ale także z wykorzystaniem spektroskopii IR oraz widm masowych ESI MS. Możliwa analiza NMR, w której prawidłowo zostały uchwycone punkty zaczepienia, nie jest nudna, chwilami ma się nawet wrażenie, że Doktorantka niczym Sherlock Holmes rozwiązuje pasjonującą zagadkę kryminalną.

Pani mgr Joanna Domagalska sprawnie posługuje się widmami ^1H - ^{13}C HMBC pozwalającymi powiązać ze sobą atomy wodoru z atomami węgla, które znajdują się w większej odległości od siebie (są oddalone o 2-4 wiązania) i które sprzęgają się ze sobą, najczęściej z udziałem małych stałych sprzężenia ($^nJ_{\text{(C-H)}} = 1\text{-}14\text{ Hz}$). Widma te mogą być optymalizowane właśnie pod kątem tych stałych. Ponieważ jednak nie znalazłem w pracy na ten temat żadnych informacji, to nasuwa pytanie, jaka jest relacja obserwowanych w widmach ^1H - ^{13}C HMBC sprzężeń dalekiego zasięgu z wartościami stałych sprzężenia $^nJ_{\text{(C-H)}}$ dla konkretnych przypisań. Czy widma te były wykonywane z zastosowaniem rutynowych parametrów, czy były optymalizowane na podstawie stałych sprzężenia, zaczerpniętych z literatury? A może stałe sprzężenia zostały wyznaczone z widm ^{13}C NMR, wykonanych bez odsprzęgnięcia od protonów?

W kolejnym fragmencie pracy Autorka przedstawia wyniki badań biologicznych. Tu trzeba przyznać, że znowu odniosła sukces, gdyż w kilku przypadkach odpowiedź biologiczna jest bardzo dobra, jak ta dla pochodnych J32 i J33. W tej części Doktorantka przeprowadziła ciekawą, merytorycznie przekonywującą dyskusję odnośnie oceny potencjału biologicznego otrzymanych związków, początkowo pod kątem działania przeciwbakteryjnego, a następnie przeciwnowotworowego. Dyskusja ta poparta jest wynikami znakomicie przeprowadzonego modelowania molekularnego, tzw. „dokowania”, oraz omówieniem zależności badanych związków od ich rozpuszczalności i lipofilowości ($\log P$). Ostatnie parametry, które są często kluczowe w poszukiwaniach struktury o najlepszej odpowiedzi biologicznej, bowiem decydują o transporcie cząsteczek poprzez warstwę lipofilową (błone komórkową) i wodną (cytoplazmę), zostały wyznaczone eksperymentalnie, szkoda tylko, że bez podania dokładności pomiaru. Należy docenić, że Doktorantka znalazła wiele zależności pomiędzy fragmentami strukturalnymi, ich właściwościami fizycznymi a aktywnością biologiczną. Wszystkie te wyniki istotnie poszerzają wiedzę na temat działania biologicznego układów makrocyclicznych typu leukomycyn. Jednakże dość duża liczba badanych obiektów, dla których wyznaczone zostały wartości $\log P$, oraz spora ilość wyników badań aktywności przeciwnowotworowej dla wielu linii komórkowych (*notabene* Doktorantka nie wspomniała, gdzie te badania zostały wykonane) nasuwają pytanie, czy były podjęte próby wyznaczenia zależności $\log(1/IC_{50})$ vs $\log P$ w celu znalezienia optymalnej wartości lipofilowości $\log P_0$.

W część eksperymentalnej Pani mgr Joanna Domagalska opisała wszystkie otrzymane związki pod kątem ich właściwości fizyko-chemicznych i z pewnością była to praca żmudna. Wiele danych zostało umieszczonych w wielostronicowych tabelach. Jednakże, o ile można przemilczeć brak nazw systematycznych tych skomplikowanych związków, to dziwi brak informacji na temat ich właściwości optycznych. Sądzę, że otrzymane związki nie były racematami (?!).

Wszystkie moje powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Jednak z obowiązku recenzenta zmuszony jestem wymienić kilka nieścisłości i niezbyt szczęśliwych sformułowań, pojawiających się w pracy. Uwagi te mają na celu ich usunięcie lub wyjaśnienie i nie umniejszają ogólnego bardzo dobrego wrażenia

- W części literaturowej na stronie 17 (wers 3 i 4), w opisie przemian reakcji związku 4 pominięto reakcję Wittiga. Trudno mi się zgodzić ze stwierdzeniem, zawartym na tej samej stronie (wers 6), że reakcja Michaela jest reakcją stereospecyficzną – może być co najwyżej reakcją stereoselektywną. Nie rozumiem ponadto jaki to jest „izopropylidenowy atom tlenu” (str. 17, wers 8). Na tej samej stronie, na rysunku 11, zamiast TeCl powinno być TsCl. Na rysunku na stronie 33 umieszczony jest siarczan VI, a w tekście (strona 34) jest mowa o siarczanie IV. Na stronach 2, 45, 50 są dwie wersje zapisu grupy tosylowej (Ts i Tos).

- W części opisującej wyniki chciałbym zwrócić uwagę na niezbyt fortunne sformułowania: na stronie 68 (wers 9): „... koreluje z sygnałami protonów z grupy metylenowej ugrupowania propargilowego nie wprowadzonego na aldehyd”, a na stronie 88 (wersy 27-29): „... posiada alkohol pierwszorzędowy”.

- W części eksperymentalnej w czterech miejscach Doktorantka do ekstrakcji używa „CH₃Cl”. Czy nie chodzi tu o CHCl₃? W innym miejscu Autorka pisze „Mieszaninę reakcyjną ekstrahowano AcOEt i solanką” (strona 164, wers 10 i 23), albo „...a pozostałość rozpuszczono w Et₂O i ekstrahowano H₂O” (strona 165). Na stronie 166 (wers 10 i 25) oraz na stronie 168 (wers 4) znajduje się fragment „... i ekstrahowano CH₃Cl i nasyconym NaHCO₃”. Ponadto na stronie 170 (wers 5 i 6) Doktorantka pisze: „a pozostałość rozpuszczono w AcOEt i ekstrahowano nasyconym NaHCO₃ (pochodną J32 i J33 rozpuszczono w H₂O i ekstrahowano CH₃CN”. W tym miejscu chciałbym zachęcić Doktorantkę do bardziej precyzyjnego opisu ekstrakcji i sposobu przemywania wyciągów organicznych. Zachęcałbym także do sprawdzenia czy na pewno ekstrakcja była prowadzona za pomocą acetonitrylu, rozpuszczalnika, który przecież miesza się z wodą w każdym stosunku.

- Na stronie 160 (wers 10) Doktorantka pisze: „rozpuszczono w 10 ml wody, a w następnej kolejności dodano 10 ml wody”. Wydaje mi się, że chodziło o dodanie też oktan-1-olu (?!).

- W opisie syntezy związków J20-J23 (strona 170) Doktorantka stosowała octan miedzi II, jednak w spisie odczynników (strona 161) oraz w części „Wyniki i dyskusja” (strona 109) wymienia octan miedzi I. Są też pewne rozbieżności dotyczące syntezy i oczyszczania związku J12 opisanego we fragmencie na stronie 85 z tym, co jest zawarte w części eksperymentalnej na stronie 167.

Jak już wspomniałem wcześniej, wszystkie te, w sumie drobne uwagi, nie obniżają wartości przedstawionej rozprawy doktorskiej, którą oceniam jako bardzo dobrą.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Domagalskiej, stanowi indywidualne rozwiązanie uzyskane w ramach procesu naukowego i spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595). Wniosuję zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Joanny Domagalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając wysoki stopień skomplikowania badań, dużą ilość wykonanych syntez i eksperymentów, profesjonalizm w interpretowaniu analiz spektroskopowych, wszechstronnie przeprowadzoną analizę wyników badań biologicznych oraz znakomite przedstawienie wyników w postaci dysertacji wnoszę też do Rady Wydziału o wyróżnienie pracy.

