

Dr hab. Wojciech P. Ozimiński, prof. NIL

Warszawa, 17.08.2017

Pracownia Modelowania Molekularnego

Narodowy Instytut Leków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Kwiczak pt.: „Fluorinated phosphonate analogues of phenylalanine – synthesis, structural studies and reactivity ”

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach współpracy międzynarodowej pod kierunkiem dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki, prof. UAM w roli promotora w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz prof. Jean-Luc Pirat w roli ko-promotora w Institut Charles Gerhardt de Montpellier we Francji. Praca o objętości sumarycznej 261 stron napisana jest poprawną angielszczyzną i składa się ze streszczenia w języku polskim, jednostronicowego wprowadzenia, przeglądu literatury o objętości 47 stron, opisu badań własnych wraz z dyskusją o objętości 61 stron oraz obszernego rozdziału o objętości 123 stron, zawierającego opis warunków prowadzenia eksperymentów, wykaz literatury (198 pozycji) oraz załączniki zawierające widma NMR.

Głównym celem pracy była synteza i potwierdzenie struktury szeregu fluorowanych w różnym stopniu aminofosfonianów będących analogami fenyloalaniny. Dodatkowymi celami pracy było zbadanie reaktywności uzyskanych cząsteczek pod kątem hydrolizy reszt fosfonianowych oraz aromatycznej substytucji nukleofilowej.

Aminofosfoniany należące do grupy związków fosforoorganicznych, są strukturalnymi analogami aminokwasów, w których grupę karboksylową zastępuje zestryfikowana reszta fosforanowa. Związki te wykazują dużą aktywność biologiczną, znajdując szerokie zastosowanie w rolnictwie i medycynie, m.in. w charakterze inhibitorów enzymów. Fluorowane w pierścieniu benzenowym analogi charakteryzują się większą lipofilowością, a przez to lepszą biodostępnością, skuteczniej penetrując podwójną warstwę lipidową błon komórkowych. Niewątpliwie synteza i badanie właściwości tego typu cząsteczek jest zagadnieniem ważnym i aktualnym, tym bardziej, że potencjalnie mogą one znaleźć zastosowanie przy opracowywaniu leków przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych lub przeciwbakteryjnych.

Rozdział pierwszy - część literaturowa, podzielony jest logicznie na pięć podrozdziałów. W pierwszym z nich Autorka wyczerpująco omawia właściwości fizykochemiczne i biologiczne fluoru. Pojawiła się tutaj drobna nieścisłość – na stronie 28 przypisano badania grupy „Burke and co-workers” do odnośnika [7], którego autorzy tylko cytują artykuł wspomnianych badaczy. Należałoby w tym miejscu raczej zacytować oryginalną pracę: T.R. Burke Jr., H.K. Kole, P.P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204 (1994), 129-134. W kolejnym, drugim podrozdziale w przejrzysty sposób zestawione są różnice strukturalne aminokwasów, kwasów aminofosfonowych i fosfonianów oraz omówiony jest wpływ fluorowania na kwasowość tych związków. Wydaje mi się, że na stronie 28 wystąpiła pomyłka – jest mowa o tym, że grupa PO_4^{2-} jest częstym ugrupowaniem w układach biologicznych, czy nie chodziło raczej o ugrupowanie PO_3^{2-} ? Nie do końca zrozumiałe jest dla mnie stwierdzenie: „The advantage of C-O-P bond over C-C-P bond is greater stability in physiological conditions” – czy na pewno tak jest? Podrozdział trzeci poświęcony jest zastosowaniom medycznym i biologicznym układów aminofosfonianów i trzeba przyznać, że jest on bardzo obszerny i dobrze zorganizowany, co świadczy o zainteresowaniu Autorki zastosowaniami medycznymi badanych związków i może w przyszłości zaowocować badaniami aktywności biologicznej tych układów. Kolejno omówione zostały zastosowania aminofosfonianów, jako związków przeciwnowotworowych, inhibitorów esterazy serynowej, kinazy fosfoglicerynianowej, fosfataz czy aminopeptydaz. W podpisach pod rysunkami zawierającymi struktury białkowe z bazy Protein Data Bank warto podawać czteroliterowe kody PDB, ponieważ bardzo ułatwia to odszukanie danej struktury w bazie. Następny, czwarty podrozdział zawiera porównanie różnych metod otrzymywania aminofosfonianów, a w jego końcowej części szczegółowe omówienie metody zastosowanej przez Autorkę – reakcji Kabachnika-Fieldsa. Reakcja ta jest w zasadzie kondensacją aldehydu, aminy oraz dwu- lub trójalkilowanego fosfonianu przebiegającą w jednym naczyniu reakcyjnym. Omówione są dwa możliwe mechanizmy tej reakcji z konkluzją, że bardziej prawdopodobny jest mechanizm przebiegający poprzez iminę, jako produkt pośredni. Szczegółowo zostały omówione także warunki prowadzenia tej reakcji. W ostatnim, piątym podrozdziale Autorka omawia reakcje aromatycznej substytucji nukleofilowej fluorowanych pochodnych benzenu przez różne nukleofile takie jak aminy, alkoholany czy tiolany a także inne, mniej typowe nukleofile. Część literaturową kończy krótki rozdział „SIGNIFICANCE AND AIMS OF THE THESIS”, w którym ponownie przedstawione są trzy główne cele pracy – (1) synteza serii pochodnych fluorowych, (2) opracowanie mono- i pełnej deprotekcji grup fosfonianowych oraz (3) zbadanie możliwości syntezy kolejnych pochodnych poprzez reakcję aromatycznej substytucji nukleofilowej. Należy w tym miejscu stwierdzić, że część literaturowa we właściwy sposób przedstawia aktualny stan badań w dziedzinie aminofosfonianów.

Rozdział Drugi stanowiący właściwy opis badań własnych Autorki podzielony jest na dziewięć podrozdziałów, w których omówione zostały kolejne etapy badań. Podrozdział pierwszy zawiera opis syntezy fenyloacetaldehydów, a więc podstawowego reagenta zawierającego atomy fluoru i mającego być przekształconym w reakcji kondensacji w iminy i dalej w aminofosfoniany. Odpowiednie aldehydy zostały otrzymane z kwasów karboksylowych poprzez redukcję do alkoholi, a następnie utlenienie do aldehydów. Punktem startowym były kwasy fenylooctowe zawierające 1, 2, 3 lub 5 atomów fluoru w pierścieniu. Pojawia się pytanie dlaczego zrezygnowano z pochodnych zawierających 4 atomy fluoru? Do redukcji kwasów karboksylowych zastosowano LiAlH_4 , postęp reakcji zachodzącej z bardzo dobrymi wydajnościami monitorowany był przy pomocy metod chromatograficznych. Metodą NMR zidentyfikowano produkt uboczny zawierający 4 atomy fluoru w pierścieniu i zaproponowano wyjaśnienie jego obecności. Przy okazji dyskusji stałych sprzężenia spin-spin w tekście pojawiają się numery poszczególnych atomów węgla - dobrze byłoby gdyby dla pełnej jasności na jednym z obrazków, te numery atomów były uwidocznione. Spośród kilku przetestowanych przez siebie reakcji utlenienia alkoholi do aldehydów ostatecznie Autorka wybrała reakcję Dess-Martin. Dodatkowym utrudnieniem okazał się fakt, że powstające aldehydy zawierające 5 oraz 3 atomy fluoru w pozycjach orto i para szybko ulegają kondensacji aldolowej, tak więc reakcję z aminami (kolejny rozdział) trzeba było przeprowadzać natychmiast po otrzymaniu aldehydu. Kolejne cztery podrozdziały opisują syntezę fluorowanych w różnym stopniu analogów fenyloalaniny. W podrozdziale drugim znajduje się opis wykonanego przez Autorkę opracowania optymalnych warunków reakcji takich jak rodzaj i ilości katalizatora, temperatura i proporcja składników. Do modelowej reakcji został wybrany perfluorowany aldehyd, anilina oraz fosfonian dietylu. Jako katalizator i jednocześnie zasada wybrany został wodorek sodu. Optymalna temperatura reakcji została ustalona na 110 °C, a współczynniki molowe aldehydu, aminy, fosfonianu dietylu oraz wodoru sodu ustalono na 1:1:2:2. Uzyskana przy tych parametrach wydajność wyniosła 50%. W toku dalszych prób syntezy okazało się, że z niektórymi aminami takimi jak benzyloamina czy też p-nitroanilina reakcja nie zachodzi, uzyskano natomiast produkt w reakcjach z p-chloroaniliną oraz różnymi toluidynami. Wydajności z zastosowaniem podstawionych amin były wyraźnie niższe niż w przypadku aniliny. W kolejnych punktach Autorka omawia mechanizm reakcji oraz opisuje identyfikację uzyskanych produktów przy pomocy metod NMR. Zwraca uwagę wielość zastosowanych metod, a wśród nich ^1H , ^{13}C , ^{19}F oraz ^{31}P NMR, a także zastosowanie technik 2D NMR: HSQC oraz COSY. Interpretacja prezentowanych widm przekonuje, że Autorka biegle opanowała techniki NMR i sprawnie posługuje się nimi przy identyfikacji substancji organicznych. W podrozdziale 3 znajdujemy opis syntezy pochodnych fosfonianowych zawierających 3 atomy fluoru. Produkt uzyskano dla wszystkich zastosowanych amin z wyjątkiem benzyloaminy. Dalsza część podrozdziału poświęcona jest identyfikacji uzyskanych produktów technikami NMR. W kolejnych podrozdziałach 4

i 5 znajdujemy opis otrzymywania i identyfikacji pochodnych podstawionych dwoma oraz jednym atomem fluoru. Co ciekawe, w przypadku pochodnych z dwoma atomami fluoru, pochodna nitrowa tworzyła się z największą wydajnością. Analiza wpływu podstawnika na wydajność tych reakcji jest skomplikowana i trudno tu o jednoznaczne wnioski, niemniej Autorka podjęła się próby interpretacji i słusznie zauważyła, że podstawniki elektronoakceptorowe w aminie, takie jak Cl powodują wzrost, natomiast podstawnik metylowy spadek wydajności reakcji. W podrozdziale 6 pokazane zostały struktury krystaliczne wybranych produktów, natomiast bardzo ciekawy jest podrozdział 7 opisujący cykliczny produkt uboczny, który tworzy się w pewnych ilościach w przypadku pochodnych perfluorowanych oraz trójpodstawionych w pozycjach orto i para. Produkt ten jest obecny ze względu na nukleofilowy atak drugorzędowej grupy aminowej na aktywowany podstawieniem fluorem atom węgla w pozycji orto. Identyfikacja produktu ubocznego nie była zadaniem łatwym i tu również Autorka wykazała się biegłością w posługiwaniu się technikami NMR oraz twórczym podejściem do problemu. W celu zilustrowania redystrybucji gęstości elektronowej pierścienia benzenowego przez podstawniki fluorowe zaprezentowane zostały nawet mapy gęstości elektronowej obliczone przy pomocy metod chemii kwantowej. Ponieważ chemia obliczeniowa jest moją podstawową dziedziną działalności naukowej nie mogę pominąć pytania dlaczego do obliczeń zastosowana została baza SDD (Stuttgart-Dresden), zwykle kojarząca się z obliczeniami relatywistycznymi dla pierwiastków ciężkich. W produktach uzyskanych przez Autorkę takie atomy nie występują i w tym przypadku baza ta sprowadza się do bazy typu D95 Dunninga. Dalej w opisie metodologii obliczeń (strona 140) podane jest, że dla atomów H,O,N,F,P,C zastosowano bazę 6-31+G(d). Poproszę o uściślenie, jaka baza była w rzeczywistości zastosowana. Co oznacza stwierdzenie: „To assess basis set effects on the results further calculations were performed with composite basis set” ? Czy zastosowano bazę CBS (complete basis set) czy też metody kompozytowe jak G2 lub G3 ? Jakie były wyniki tego porównania ? Jakim oprogramowaniem były prowadzone obliczenia ? Generalnie dobrą praktyką w takich sytuacjach jest posługiwanie się modelami obliczeniowymi zastosowanymi z powodzeniem przez innych badaczy, w tym przypadku mogłyby to być modele opisane w odnośnikach 119 i 122, cytowanych w podrozdziale 9. Dalej przechodzimy do podrozdziału 8 gdzie opisana jest metoda monodeprotekcji grupy fosfonianowej z udziałem jodku litu w acetonitrylu, jako rozpuszczalniku. Reakcja najłatwiej zachodziła w przypadku pochodnej perfluorowanej, dla pozostałych pochodnych czasy reakcji były dłuższe. Dalej opisana jest pełna deprotekcja zachodząca poprzez produkt pośredni - trimetylosilylową pochodną, która następnie jest poddawana metanolizie do odpowiedniego kwasu fosfonowego. Pozostaje jeszcze podrozdział 9 traktujący o aromatycznej substytucji nukleofilowej uzyskanych pochodnych fosfonianowych. Na początku rozdziału Autorka wyjaśnia przyczyny preferencyjnego podstawienia w pozycji para w stosunku do podstawnika nie będącego atomem fluoru. Wyjaśnienia przedstawione na stronie 117

zilustrowane są oczywiście na rysunku Fig.2.23, a nie 2.22. Mimo zastosowania różnych warunków substytucja w pierścieniu aromatycznym zaszła tylko w przypadku pochodnych perfluorowanych, w przypadku obecności 3 i mniej atomów fluoru aktywacja pierścienia nie była wystarczająca. Być może gdyby przebadane zostały pochodne zawierające 4 atomy fluoru okazałoby się, że substytucja również zachodzi – może to być temat na kolejną publikację. W toku badań okazało się, że twarde nukleofile atakują raczej łańcuch boczny, a nie pierścień, natomiast w przypadku fenoli, tioli i amin aromatyczna substytucja nukleofilowa zachodzi z dobrą wydajnością i Autorka otrzymała i zidentyfikowała tą drogą szereg para podstawionych pochodnych, które mogą w przyszłości zostać przebadane pod kątem aktywności biologicznej.

Dalej następuje zwięzłe podsumowanie całej rozprawy w punktach, a następnie rozdział „Konkluzje i perspektywy” będący bardziej opisowym podsumowaniem i naszkicowaniem ewentualnych zastosowań uzyskanych cząsteczek.

Muszę stwierdzić, że praca napisana jest w zrozumiałym i przejrzystym stylu i czyta się ją dobrze, również, gdy nie jest się specjalistą w dziedzinie syntezy organicznej. Liczba błędów i pomyłek jest niewielka, co świadczy o dużej staranności w przygotowywaniu rozprawy. Drobne uwagi i pytania recenzenta w niczym nie umniejszają wysokiej wartości naukowej rozprawy. Autorka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem syntezy organicznej i identyfikacji substancji organicznych, twórczym podejściem do napotykaných problemów oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Praca stanowi wartościowe i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i stanowi znaczący wkład w dziedzinę chemii organicznej.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie pani mgr inż. Joanny Kwiczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech P. Ozimiński