



Białystok, 13.06.2016 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Domagalskiej

pt. „Modyfikacja aglikonu josamycyny z wykorzystaniem regioselektywnej substytucji nukleofilowej typu S_N1 i dipolarnej cykloaddycji Huisgena”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska magister Joanny Domagalskiej wykonana została w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Piotra Przybylskiego prof. UAM i dr Krystiana Pyty jako promotora pomocniczego. Rozprawa formalnie liczy 233 ponumerowanych stron, ale znaczną jej część stanowią widma (48 stron) i tabele z opisem widm (25 stron). Rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich z zakresu chemii organicznej, a najważniejszym jej elementem jest omówienie uzyskanych wyników i ich dyskusja (75 stron). W pracy zacytowano 157 pozycji literaturowych.

Josamycyna jest antybiotykiem makrolidowym pochodzenia naturalnego. Wykazuje szerokie spektrum działania przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i bakteriom opornym na erytromycynę. Wzrastająca antybiotykooporność wśród patogenów układu oddechowego wymusza poszukiwania nowych związków, które mogłyby być zastosowane w trudnych przypadkach. Celem pracy doktorskiej była synteza serii nowych pochodnych Josamycyny podstawionych w pozycji C13, zbadanie zależności struktura – aktywność biologiczna (antybakteryjna i antynowotworowa) dla tej grupy pochodnych oraz ustalenie sposobu wiązania w tunelu rybosomalnym dużej podjednostki rybosomu bakterii w oparciu o modelowanie molekularne.

W części literaturowej pracy doktorantka zwięźle przedstawiła antybiotyki makrolidowe i ich podział, m.in. ze względu na wielkość pierścienia. Josamycyna posiada 16-członowy pierścień laktonowy i należy do grupy leukomycyn wyizolowanych ze szczepów bakterii *Streptomyces*. Związki te posiadają identyczny aglikon i część cukrową składającą się z mykaminozy i mykarozy, różnią się tylko grupami acylowymi w podstawnikach estrowych. Doktorantka opisała historię odkrycia, biosyntezę, syntezę totalną oraz mechanizm aktywności biologicznej leukomycyn, jak również wcześniej przeprowadzane modyfikacje josamycyny. Wśród nich były pochodne izojosamycyny, które się tworzą w wyniku przegrupowania allilowego, reakcji wykorzystywanej również w syntezie pochodnych opisanych w pracy doktorskiej. Te informacje stanowią znakomite wprowadzenie w tematykę pracy doktorskiej. W części literaturowej

przedstawiona została też reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, która posłużyła doktorantce do otrzymania serii pochodnych z pierścieniem 1,2,3-triazolowym. Trzecim tematem poruszonym w części literaturowej były reakcje substytucji nukleofilowej, które były wykorzystywane w syntezie pochodnych. Przedstawiony opis mechanizmów jest poprawny, ale zawartość merytoryczna tego rozdziału niewiele wykracza poza zakres informacji podawanych w podręcznikach chemii organicznej. Cała część literaturowa jest napisana kompetentnie, poprawnie na ogół pod względem stylu i języka (z wyjątkiem str. 24 „jak wykazano przez Przybylskiego”, powinno być „jak wykazał Przybylski”; str. 50 „wyjściowy substrat”), ale doktorantka nie ustrzegła się też kilku błędów merytorycznych (str. 16, Rys. 10: brak eterowej grupy metylowej w związku 4; str. 26, na Rysunku 18 w strukturze K niepotrzebny atom wodoru przy tlenie aldehydowym; str. 28: „reakcja redukcji pierścienia” – zapewne chodzi o kontrakcję pierścienia; str. 45: w szeregu grup opuszczających Cl⁻ występuje dwukrotnie; str. 52: prawdopodobnie chodzi o reakcje z eterami silylowymi enoli, które prowadzą do aldehydów lub ketonów – brakuje atomów tlenu we wzorach nukleofili).

Pierwszym etapem zaplanowanych przemian była eliminacja typu E1cB cząsteczki kwasu octowego w josamycynie, gdyż wcześniejsze badania wykazały, że produkt tej reakcji ma lepsze właściwości przeciwbakteryjne. Reakcja ta musi być prowadzona w obniżonej temperaturze, aby uniknąć następczej reakcji wewnątrzcząsteczkowej addycji Michaela z utworzeniem produktu bicyklicznego. Przebieg reakcji był kontrolowany na HPLC, a wyodrębniony produkt został poddany dogłębnej analizie widmowej. Sprężenie powstałego wiązania podwójnego z laktonową grupą karbonylową powoduje wzrost naprężenia w pierścieniu makrocyklicznym i przyjęcie przez niego konformacji, w której układ dienowy i nowe wiązanie podwójne są równoległe.

W następnym etapie przeprowadzono jego reakcję z alkoholem propargilowym katalizowaną *p*-TsOH. Zgodnie z oczekiwaniem alkohol ulegał przyłączeniu przy C13 z jednoczesnym przegrupowaniem allilowym. Jednak w reakcji uczestniczyła też reaktywna grupa aldehydowa ulegając przekształceniu do odpowiedniego acetalu, a dodatkowo zachodziła hydroliza wiązania glikozydowego w disacharydzie z odszczepieniem izowalerylomykarozy. Taki przebieg reakcji został dobrze udokumentowany, przede wszystkim za pomocą jedno- i dwuwymiarowych technik NMR. Doktorantka wykazała się dużą biegłością w interpretacji widm, co pozwoliło jej na jednoznaczne przypisanie struktury produktowi reakcji. W szczególności wykazała, że nukleofil przyłącza się regio- i stereoselektywnie do C13 od strony α . Struktura produktu, konfiguracja na C13 i konformacja aglikonu zostały potwierdzone przez analizę widm NOESY i obliczenia DFT.

W następnym etapie podjęta została próba odblokowania grupy aldehydowej. Selektywne zdjęcie blokady acetalowej w łagodnych warunkach zakończyło się niepowodzeniem. Zachodziła tylko selektywna hydroliza eteru propargilowego przy C13 z retencją konfiguracji na tym centrum stereogenicznym. Ponieważ acetal propargilowy okazał bardzo oporny na hydrolizę, doktorantka przeprowadziła syntezę acetalu metylowego josamycyny. Ponieważ zastosowane warunki reakcji (MeOH, *p*-TsOH, 0 °C) były analogiczne do reakcji z alkoholem propargilowym zastanawia mnie dlaczego tworzeniu acetalu nie towarzyszyło tym

razem podstawienie na C13 z przegrupowaniem allilowym ani hydroliza wiązania glikozydowego. Mam nadzieję, że doktorantka wyjaśni mi to w czasie obrony pracy. Acetal metylowy okazał się łatwiejszy do usunięcia niż propargilowy. Jednak podczas jego reakcji z alkoholem propargilowym w środowisku kwaśnym zachodziła transketalizacja (oraz hydroliza wiązania glikozydowego). W tej sytuacji doktorantka postanowiła przed reakcją z nukleofilem zacetylować grupę hydroksylową przy C2' w części cukrowej josamycyny. Wiadomo było bowiem, że jej obecność zmienia konformację, a zarazem reaktywność układu makrolidowego. Okazało się jednak, że otrzymana pochodna acetylowa ulegała z bardziej zasadowymi reagentami (NaN_3 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{SNa}$), zamiast podstawieniu nukleofilowemu, wewnątrzcząsteczkowej addycji Michaela anionu enolanowego do α,β -nienasyconego laktonu z utworzeniem niepożądanego produktu bicyklicznego. Natomiast z alkoholami (propargilowy, pent-4-yn-1-ol, 2-fluorobenzylowy) zachodziły reakcje podobne do wcześniej opisanych, czyli podstawienie przy C13 z jednoczesnym utworzeniem acetalu i hydrolizą wiązania glikozydowego.

Ponieważ źródłem problemów okazała się obecność w josamycynie grupy aldehydowej, która nie jest niezbędna dla jej aktywności biologicznej, doktorantka postanowiła przeprowadzić jej redukcję do pierwszorzędowego alkoholu. Okazało się, że redukcji za pomocą NaBH_4 towarzyszyła eliminacja kwasu octowego. Aby proces eliminacji doprowadzić do końca dodano do mieszaniny reakcyjnej KOH . Otrzymany produkt redukcji poddano pełnej analizie widmowej, a następnie przeprowadzono serię jego reakcji z różnymi alkoholami w środowisku kwaśnym. Zgodnie z oczekiwaniem wszystkie reakcje zachodziły na C13 z jednoczesną hydrolizą wiązania glikozydowego. Doktorantka dokładnie zbadała mechanizm reakcji z alkoholem propargilowym z uwzględnieniem badań kinetycznych, które wykazały, że jej szybkość nie zależy od stężenia alkoholu propargilowego, natomiast jest proporcjonalna do stężenia $p\text{-TsOH}$. Dowodzi to, że etapem decydującym o szybkości substytucji jest protonowanie grupy opuszczającej ($9\alpha\text{-OH}$). Zgodnie z danymi doświadczalnymi zaproponowała mechanizm $\text{S}_{\text{N}}1'$, w którym tworzy się mezomeryczny karbokation. Przeprowadziła modelowanie produktu pośredniego wykazując, że największy ładunek dodatni przypada w nim na C13. Jednocześnie analiza wykazała, że podejście nukleofila jest uprzywilejowane od strony α . Tłumaczy to regio- i stereoselektywność reakcji z alkoholem propargilowym i innymi nukleofilami.

Opisaną powyżej 9α -propargiloksyłową pochodną doktorantka poddawała reakcjom 1,3-dipolarnej cykloaddycji z różnymi azydkami. Otrzymała w ten sposób serię 14 pochodnych izojosamycyny, w których obecna jest podstawiona grupa 9α -triazolometoksyłowa. Podstawnikami były różne grupy benzyłowe, ftalimidoalkilowe, cykloheksyloalkilowe, 2- lub 6-glukozyłowe i inne. Wszystkie otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane pod względem fizykochemicznym (analiza spektroskopowa, rozpuszczalność, lipofilowość) i poddane badaniom biologicznym na aktywność przeciwbakteryjną i cytotoksyczność. Wyniki badań biologicznych skorelowano z wynikami modelowania molekularnego w tunelu rybosomalnym, którego model otrzymano przez wycięcie odpowiedniego fragmentu ze struktury krystalograficznej dużej podjednostki rybosomalnej. Okazało się, że różne deficyty strukturalne, takie jak brak grupy aldehydowej,

izowalerylomykarozy, zmiana struktury wiązań podwójnych w układzie makrocyclicznego laktonu i konformacji tego pierścienia, jak też obecność dużego podstawnika w pozycji 9α , nie stanowią zasadniczej przeszkody dla aktywności biologicznej tych układów. Chociaż aktywność przeciwbakteryjna otrzymanych układów była niższa od josamycyny, to w przypadku pochodnych z podstawnikami cukrowymi cytoksyczość nie tylko przewyższała macierzysty antybiotyk, ale nawet była wyższa od zastosowanego wzorca - cytarabiny. Ciekawe, że w przypadku pochodnej z podstawnikiem trifluorometoksybenzylowym pojawiła się aktywność przeciwgrzybicza, której nie obserwuje się dla josamycyny.

Praca doktorska mgr Joanny Domagalskiej napisana jest inteligentnie, prostym i zrozumiałym językiem. Czytanie pracy ułatwiają załączniki ze schematami przeprowadzonych przemian. Również numeracja atomów węgla na prawie wszystkich wzorach jest bardzo przydatna. W pracy jest bardzo niewiele błędów, ale niektóre z zauważonych przeze mnie wymienię z obowiązku recenzenta.

Załącznik 1 (na odwrocie): „2-fluorobenzyl alkohol” – w jakim to języku?

Str. 64, 110: „widmo masowe”; powinno być „mas”;

Str. 86: czy JOS' na chromatogramie i JOS_{red} na schemacie i w tekście oznacza ten sam produkt?

Str. 88: „związek posiada alkohol” – żargon (powinno być „grupę hydroksylową”);

Str. 77, 108, 109: „grupa alkoksypargilowa”; powinno być „pargiloksylova”;

Str. 113: „pierścień benzylowy” – co to takiego?

Str. 160: „rozpuszczono w 10 ml wody i dodano 10 ml wody” – może oktanolu?; „wyniki zawarte są w tabeli 9 i 10” – chyba w tabelach 10 i 11.

Doktorantka wykazała się dobrą znajomością nowoczesnej chemii organicznej. Jest Ona współautorką trzech publikacji w dobrych czasopismach, chociaż tylko jedna z nich zawiera wyniki opisane w pracy doktorskiej. Na szczególne uznanie zasługuje skrupulatna analiza danych widmowych wszystkich związków, pełne przypisanie sygnałów w widmach ^1H i ^{13}C NMR, interpretacja widm dwuwymiarowych oraz wybranych pasm w IR, a także skorelowanie wyników badań biologicznych z pomiarami fizykochemicznymi ($\log P$ i rozpuszczalność) oraz wynikami modelowania molekularnego. Praca wykonana jest bardzo solidnie a uzyskane wyniki budzą moje pełne zaufanie.

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

Jacek Morayek