

Prof. dr hab. Piotr Kielbasiński
Kierownik Zakładu Chemii Heteroorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Tel: (42) 680 32 21; 681 58 32; Fax.: (42) 680 32 61
E-mail: piokiel@cbmm.lodz.pl

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Katarzyny Zielińskiej

pt.:

*Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasów 1-(N-acyloamino)-
alkilofosfonowych, 1-(N-acyloamino)alkilofosfinowych oraz ich estrów
za pomocą acylazy penicylinowej G w postaci natywnej i immobilizowanej*

Kwasy aminofosfonowe są od wielu lat przedmiotem dużego zainteresowania z uwagi na ich różnorodną aktywność biologiczną i zastosowanie w medycynie. Stąd też, synteza tego typu pochodnych, szczególnie w formie enancjomerycznie czystej lub choćby wzbogaconej, jest przedmiotem wielu publikacji. Generalnie, poszukiwanie nowych, wysokowydajnych metod syntezy chiralnych substancji organicznych o określonej absolutnej konfiguracji i wysokich nadmiarach enancjomerycznych jest ciągle jednym z najważniejszych celów badawczych chemików. Wynika to zarówno z zainteresowań poznawczych ukierunkowanych na badanie mechanizmów różnych reakcji jak i z ciągle rosnących wymagań komercyjnych, związanych z powszechnym już obowiązkiem badania aktywności biologicznej każdego stereoizomeru nowo wprowadzanego na rynek produktu chemicznego. Wśród szeregu metod stosowanych w tym celu, te oparte na biokatalizie zajmują poczesne miejsce i stanowią niejednokrotnie atrakcyjną alternatywę dla typowych metod chemicznych. Enzymy, stworzone przez naturę biodegradowalne katalizatory, mające za zadanie przyspieszanie i regulowanie procesów zachodzących w organizmach żywych, okazały się zdolne do akceptowania szerokiej gamy substratów nienaturalnych i przekształcania ich w sposób wysoce chemo-, regio- i stereoselektywny. Przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej, poświęcona właśnie badaniom nad syntezą enancjomerycznie czystych kwasów aminofosfonowych i aminofosfinowych w warunkach katalizy enzymatycznej, wpisuje się w ten aktualny i nowoczesny nurt. Warto dodać, że wykorzystuje ona jako

substraty *N*-acylo pochodne kwasów aminofosfonowych i aminofosfinowych, których oryginalna synteza została opracowana w ramach wieloletnich badań prowadzonych w zespole kierowanym przez promotora Doktorantki, Pana Profesora Romana Mazurkiewicza.

Dysertacja jest stuśsześćdziesięciopięciostronicowym opracowaniem, podzielonym klasycznie na trzy główne części: „Część literaturową”, „Omówienie wyników” i „Część eksperymentalną.” Całość uzupełniają: „Założenia i cel pracy”, „Wnioski”, „Literatura” i „Załączniki.”

Rozdział „Założenia i cel pracy” szczegółowo przedstawia zakres planowanych prac. Autorka wyraźnie informuje, że podobne badania były już prowadzone i opisane ponad dwadzieścia lat temu (odnośniki 7-10). Jej zamierzenia ukierunkowane są jednak na znaczne poszerzenie liczby badanych przypadków, jak również wprowadzenie nowej metodologii, co w porównaniu z cytowaną literaturą nadaje tej pracy wyraźny element nowości naukowej.

Rozdział „Część literaturowa,” liczący 64 strony, podzielony jest na trzy części, które korespondują z tematyką pracy. W pierwszej części Autorka dość szczegółowo omawia fosforowe analogi aminokwasów, w tym chemiczne metody ich stereoselektywnej syntezy. W drugiej przedstawia ogólne podstawy enzymatycznych syntez związków nieracemicznych, oraz opisane dotąd w literaturze przykłady enzymatycznego kinetycznego rozdziału racemicznych fosforowych analogów aminokwasów. I wreszcie w trzeciej części zajmuje się acylazami penicylinowymi, których przedstawicielkę, acylazę penicylinową G, stosuje w swoich badaniach oraz załącza obszerny fragment dotyczący immobilizacji tejże acylazy. Generalnie rozdział ten jest napisany ciekawie i wskazuje na dobrą orientację Doktorantki w omawianym temacie. Nie udało się jednak uniknąć pewnych błędów i niedociągnięć, które z obowiązku recenzenta wymieniam poniżej.

- Do zbioru publikacji opisujących stereoselektywne syntezy fosforowych analogów aminokwasów należałoby dodać trzy istotne prace z roku 2015: T. K. Olszewski, M. Majewski, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 846-852; F. Palacios i wsp. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 156-164; i pracę przeglądową M. Ordonez et al. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1745-1784.
- Str. 7, w. 2 od dołu: DMSO to po polsku sulfotlenek dimetylowy (lub wg nowo wprowadzanej nomenklatury sulfoksyd dimetylowy), a nie dimetylosulfotlenek.
- Str. 8, w. 9 od góry: HFIP to alkohol heksafluoroizopropylowy, a nie heksafluorodiizopropylowy.

- Str.8, w. 13 i 14 od dołu: niewłaściwe są nazwy „heksametylodisilazan litu/potasu”, prawidłowa natomiast jest nazwa „bis(trimetylosililo)amidek litu”, w. 9 od dołu.
- Str. 16, w. 2 od dołu: prawidłowa nazwa to „Captopril”.
- Str. 24 w. 4 od dołu i 25, w. 5 nad Schematem 2.5: zwrot „alkilowanie z heksametylodisilazaniem litu/potasu” nie wydaje się prawidłowy, bo bis(trimetylosililo)amidek litu/potasu (patrz uwaga powyżej) jest zasadą, a czynnikiem alkilującym są halogenki alkilu. Lepiej więc powiedzieć „w obecności bis(trimetylosililo)amidku litu/potasu.”
- Str. 31 w. 2 pod Tabelą 2.5: w pracach Mikołajczyka i Łyżwy stosowano enancjomerycznie czyste sulfiniminy a nie sulfonimidy, które skądinąd byłyby achiralne. Podobnie na str. 32, w. 2 pod Schematem 2.14 zamiast α -hydrokysulfoniminy powinno być α -hydrokysulfiniminy. Ponadto, pokazany w Schemacie 2.15 reagent to sól potasowa fosfonianu (lub fosforynu) dimetylu. Analogiczne nieprawidłowości nomenklaturowe znaleźć można na str. 33 (zamiast fosfinian dimetylu, powinno być *H*-fosfonian lub fosforyn dimetylu), a na str. 34 *H*-fosfonian lub fosforyn di(*O*-nitrofenyłu), a nie di(*O*-nitrofenyło)fosfinian.
- Str.41: Tytuł Tabeli 2.10 powinien dotyczyć uwodornienia związków LXXVII, a nie LXXVIII, gdyż te ostatnie są produktami omawianej reakcji.
- Str. 42 i następne: Jestem zdania, że bardziej właściwym odnośnikiem, dotyczącym ogólnych zasad transformacji przy użyciu enzymów, byłby podręcznik K. Fabera "Biotransformations in Organic Chemistry", którego szóste już wydanie ukazało się w roku 2011. Z kolei, „deracemizacja” jest pojęciem ogólnym, oznaczającym przekształcenie racematu w jeden enancjomer chiralnej substancji, a dynamiczny rozdział kinetyczny to tylko jeden z jej typów; stąd ten ostatni powinien znaleźć się w podrozdziale zatytułowanym „Deracemizacja”.
- Drobne pomyłki w numeracji związków lub we wzorach, które nieco utrudniają czytanie pracy, np.: na str. 61 w Schemacie 2.45 powinien być numer XCVII a nie CVII.

Przechodząc do omówienia najważniejszej części rozprawy, liczącego 57 stron "Omówienia wyników", chciałbym podkreślić szeroki zakres wykonanych badań. Część ta składa się z pięciu podrozdziałów, z których pierwszy opisuje syntezę wszystkich substratów, drugi przygotowanie i określenie aktywności immobilizowanej acylazy penicylinowej G, trzeci oznaczanie początkowych szybkości hydrolizy racemicznych substratów, czwarty –

najistotniejszy – kinetyczny rozdział kwasów 1-(*N*-acyloamino)fosfonowych i fosfinowych oraz piąty, zastosowanie układu przepływowego do rozdziału kinetycznego wybranego substratu.

Syntezę substratów przeprowadziła Autorka wykorzystując opracowaną wcześniej w zespole prof. Mazurkiewicza trój etapową metodę, w której ostatni etap polegał na podstawieniu grupy trifenylofosfoniowej w uzyskanych wcześniej solach 1-(*N*-acyloamino)alkilotrifenilofosfoniowych odpowiednimi nukleofilami fosforowymi. Synteza ta opisana jest bardzo szczegółowo dla każdego etapu, a charakterystyki spektralne otrzymanych półproduktów i produktów finalnych umieszczone w potężnych tabelach. Tabele te zastępują dane, które zwykle umieszczane są w części eksperymentalnej. Nie czynię z tego zarzutu przyjmując, że jest to nieco inna forma prezentacji dużej liczby zsyntetyzowanych, niekiedy po raz pierwszy, substratów do planowanych hydroliz enzymatycznych.

Określenie początkowych szybkości hydrolizy enzymatycznej zsyntetyzowanych substratów pozwoliło na wyciągnięcie wniosków dotyczących ich reaktywności w zależności od struktury (kwasy lub ich estry, w tym z podstawnikami różnej wielkości), rodzaju grupy acylowej (silna preferencja enzymu w stosunku do grupy fenyloacetylowej), efektu sterycznego podstawnika w pozycji α , czy wreszcie koniecznej obecności atomu wodoru przy atomie azotu związanym z grupą acylową. Badania te wykazały również, że immobilizacja enzymu wpływała umiarkowanie na jego aktywność hydrolityczną.

Doktorantka przeprowadziła reakcje kinetycznego rozdziału szerokiej gamy substratów o zróżnicowanej budowie i udowodniła, że w większości przypadków charakteryzowały się one znakomitą stereoselektywnością, zarówno przy zastosowaniu natywnej jak i immobilizowanej formy acylazy penicylinowej G. Ciekawą nowością było zbadanie przebiegu kinetycznego rozdziału 1-(*N*-fenyloacetyloamino)-2-karbamoiloetylofosfonianu dimetylu **5g** (dlaczego akurat ten substrat?) na monolicie krzemionkowym z immobilizowaną acylazą w układzie przepływowym, które dowiodło, iż metoda ta może być z powodzeniem stosowana przy podobnych transformacjach enzymatycznych.

Zastosowanie HPLC z użyciem kolumn z chiralnym wypełnieniem okazało się najbardziej skutecznym sposobem określania nadmiarów enancjomerycznych zarówno produktów jak i nieprzereagowanych substratów. Z kolei, z zamieszczonych na str. 117 widm NMR enancjomerycznie wzbogaconych substratów, wykonanych w obecności chininy jako chiralnego odczynnika solwującego, wynika, że zastosowanie tego podejścia mogło być obarczone sporym błędem ze względu na dość słabe rozgraniczenia sygnałów.

Mimo ogólnie bardzo pozytywnego wrażenia co do uzyskanych wyników i ich prezentacji, pozwalam sobie mieć kilka pytań i uwag do tej części pracy. Wymieniam je poniżej.

- Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem ze str. 118 i 119, że wzory na stereoselektywność enzymu E (równania 2.1 i 3.5, nota bene wyprowadzone już w roku 1982 przez Siha i wsp., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299) nie mogą być stosowane w przypadku wysokiej stereoselektywności reakcji, gdyż prowadzą do ujemnych wartości E. Problem nie wynika z samego wzoru, lecz z niewłaściwego określenia stopnia konwersji "c." Określanie tego stopnia na podstawie wydajności nieprzereagowanego substratu i produktu lub choćby widm NMR mieszanin poreakcyjnych (zwykle po koniecznej wstępnej obróbce) jest obciążone poważnym błędem. Z tego względu, wartość „c” obliczać się powinno na podstawie nadmiarów enancjomerycznych substratu i produktu, wg wzoru $c = ee_s / ee_s + ee_p$. Uzyskana w ten sposób wartość, wstawiona do któregośkolwiek wzoru Siha, nigdy nie da ujemnej wartości E. W cytowanym podręczniku Fabera wzór 3.5 przekształcony przy zastosowaniu tego podejścia ma postać (str. 41):

$$E = \frac{\ln \frac{[ee_p(1 - ee_s)]}{(ee_p + ee_s)}}{\ln \frac{[ee_p(1 + ee_s)]}{(ee_p + ee_s)}}$$

Ponieważ jednak Autorka nie oznaczała nadmiaru enancjomerycznego produktów, co mnie trochę dziwi, nie mogła zastosować tego podejścia. A szkoda, bo w niektórych przypadkach uzyskałaby wartości E dużo wyższe niż 100. Np.: gdyby w Tabeli 3.11 dla związku **5b** Autorka uzyskała $c = 0.47$ ze wzoru $c = ee_s / ee_s + ee_p$ (zamiast oznaczonego 0.46, co daje minimalną różnicę przy stosowanym przez Nią pomiarze), wartość E nie tylko nie byłaby ujemna, ale wyniosła 258, zaś dla związku **5c** przy obliczonej wartości $c = 0.498$ (zamiast wyznaczonej 0.49) $E = 4416!$ Proszę sprawdzić.

- W Tabeli 3.11 związek **5k** to nie jest opisany na str. 110, w. 15 od dołu, „ester dimetylowy kwasu 1-(*N*-fenyloacetylo-*N*-metyloamino)etylofosfonowego.” To samo jest na str. 120, w. 6 od góry.
- Tabela 3.15, str.126: błąd w nazwie; są to kwasy 1-aminoalkilofosfonowe i 1-aminoalkilo-*H*-fosfinowe, a nie ich *N*-acylopochoodne.

Wszystkie eksperymenty są skrupulatnie opisane w dwudziestościennej „Części eksperymentalnej”. Załączone przepisy są dokładne i pozwalają odtworzyć opisywane procedury. Zamieszczone przy opisach schematy i wzory pozwalają łatwo odszukać odpowiednie transformacje. (drobny błąd wkraść się w Schemacie 5.11 – brak atomu tlenu w substracie).

Pracę zamyka spis literatury obejmujący 185 pozycji. Pewne moje wątpliwości wzbudza sposób pisania odnośników – nie wydaje mi się właściwe wstawianie łącznika „oraz” przed ostatnim nazwiskiem autora. W nielicznych przypadkach Autorka podała pełne nazwy czasopism zamiast odpowiednich skrótów.

Oceniając uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy podkreślić ich oryginalność i wartość merytoryczną, czego dowodem może być fakt, iż część z nich stała się przedmiotem dwóch publikacji zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej, i trzeciej będącej w fazie przygotowania do wysyłki. Doktorantka jest również współautorką 11 innych publikacji, niewchodzących w zakres ocenianej pracy doktorskiej, chociaż tematycznie związanych z dyskutowanymi zagadnieniami, trzech zgłoszeń patentowych oraz szeregu prezentacji konferencyjnych. Trzeba również dodać, że przedstawione w dysertacji rezultaty świadczą o samodzielności i dużej zręczności Autorki w wykonywaniu niełatwych prac eksperymentalnych oraz o dobrym opanowaniu metod analitycznych. Pozytywnie ocenić należy również stronę edytorsko-redakcyjną rozprawy oraz logiczną i jasną prezentację materiału (choć gdzieś wkradły się błędy literowe, powodując nawet nieprawidłowości ortograficzne).

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana praca wnosi znaczący wkład w dziedzinie stereoselektywnej syntezy fosforowych analogów aminokwasów i poszerza zakres biokatalizy. Przedstawione w recenzji nieliczne uwagi krytyczne, głównie dotyczące strony formalnej lub nomenklatury, nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę rozprawy. Uzyskane wyniki oraz sposób ich interpretacji i prezentacji dowodzą dużej wiedzy Autorki w dziedzinie syntezy organicznej.

W związku z powyższym uważam, że recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r. i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, wielkość przedstawionego materiału doświadczalnego i bardzo dobry sposób jego prezentacji oraz fakt opublikowania rezultatów w dwóch wysoko notowanych czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej, wnoszę do Rady Wydziału o przyznanie wyróżnienia Autorce dysertacji, Pani mgr inż. Katarzynie Zielińskiej.

Łódź, 30 sierpnia 2016 r.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Miłobas", with a long horizontal flourish extending to the right.