

Dr hab. Grażyna Groszek, prof. PRZ

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Michała Pieczykolana pt.

„*Synteza karbapenamów z pięcioczłonowego nitronu cukrowego o konfiguracji L-treo drogą 1,3-dipolarnej cykloaddycji*”

Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska została wykonana przez mgra Michała Pieczykolana w latach 2011-2017 w Instytucie Chemii Organicznej PAN, promotorem rozprawy był prof. Marek Chmielewski.

Rozprawa wpisuje się w tematykę prowadzoną w II-im Zespole Instytutu i dotyczy ona zastosowania metod syntezy stereoselektywnej do konstrukcji pierścienia β -laktamowego z użyciem substratów pozyskiwanych ze źródeł naturalnych. Cel nadrzędny, jaki postawił sobie Doktorant to otrzymanie antybiotyku karbapenemowego - tienamycyny. Cel ambitny, bo od czasu opublikowania wykrycia tienamycyny w 1975 roku przez naukowców firmy Merck ukazało się wiele publikacji dotyczących zarówno syntezy samej tienamycyny, w formie racemicznej i enancjomerycznej, oraz syntez formalnych. Zatem „wcisnąć się” z nowym sposobem jej otrzymania to nie lada wyzwanie.

Praca liczy 146 stron maszynopisu podzielonego na pięć rozdziałów o tytułach zgodnych z ich treścią, uzupełniona o dodatkowe rozdziały, wskazane dla tego rodzaju opracowań. Są to spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wykaz dorobku Autora oraz eleganckie podziękowania dla wybranych osób.

We wstępie (6 str.) Autor obszernie wprowadza nas w tematykę podkreślając jak ważne są związki zawierające w swej strukturze szkielet karbapenemu w aspekcie ich wykorzystania jako antybiotyku o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego i odpornego na działanie enzymów β -laktamazy. Jednocześnie, opisem dotychczasowych sukcesów użycia strategii Tufariello’ego tworzenia pierścienia czteroczłonowego β -laktamu z nienasyconych 6-członowych laktonów cukrowych i diarylo- lub aryloalkilo-nitronów, zaadoptowanej przez Chmielewskiego i Furmana, formułuje cel jaki chce uzyskać w swoich badaniach. Jest on dwukierunkowy i jest to użycie nitronu **16**:

po pierwsze – w procesie 1,3-dipolarnej cykloaddycji do pięcio- i sześcioczłonowych laktonów aby określić proporcje produktów *egzo* i *endo* addycji i wskazać ich potencjał syntetyczny,

po drugie – w procesie 1,3-dipolarnej cykloaddycji z pochodną krotonianu, do otrzymania tienamycyny.

Autor kończy ten rozdział stwierdzeniem, tu cytat: „W efekcie moich prac udało się ocenić przydatność nienasyconych laktonów w syntezie karbapenemów, a także dokonać formalnej syntezy tienamycyny z krotonianu i nitronu otrzymywanego z 2-deoksy-D-rybozy”.

I w tym momencie można by zakończyć przedmiotową recenzję. (sic.)

Nic z tego, recenzent analizuje/ocenia dysertację, szukając odpowiedzi na pytanie: Jak się Autorowi udało tego dokonać?

Następny rozdział dysertacji pt. *Część Literaturowa* (48 str.) to nic innego, jak stan wiedzy dotyczący udokumentowanych rozwiązań w przedmiocie recenzowanej pracy. I tutaj Autor wykazał profesjonalizm. Treść podrozdziałów odpowiada na potencjalne pytania jakie zadamy. Wgłębiając się w treść podrozdziałów, znajdziemy opis dotychczasowych rozwiązań problemów z jakimi może się spotkać w realizacji postawionych celów. Autor syntetycznie je punktuje i odpowiada na pytania:

a) Jak działają antybiotyki β -laktamowe? – odpowiedź znajdziemy w podrozdziale pierwszym części literaturowej zatytułowanym *Antybiotyki β -laktamowe – struktura i właściwości biologiczne* (2 str.),

b) Jak syntezuje się antybiotyki β -laktamowe? – odpowiedź znajdziemy w podrozdziale drugim zatytułowanym *Synteza antybiotyków β -laktamowych* (12 str.) i tutaj Autor analizuje drogi syntezy antybiotyków karbapenemowych, ze szczególnym uwzględnieniem syntezy samej tienamycyny – jej formy racemicznej oraz optycznie czynnej i jej formalnej syntezy,

c) Jak konstruuje się pierścień β -laktamowy w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji? –

W podrozdziale zatytułowanym *Zastosowanie reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronów do olefin w syntezie związków zawierających pierścień β -laktamowy* (10 str.) – znajdziemy informacje o wykorzystaniu jej do formowania szkieletu karbapenamu na dwa sposoby to jest formowania pierścienia β -laktamowego z użyciem wewnątrzcząsteczkowej reakcji *N*-acylowania i dobudowanie sąsiedniego pierścienia, albo odwrotne formowanie pierścienia β -laktamowego przy pierścieniu pochodnej pirolidyny. To drugie podejście syntetyczne z powodzeniem zostało wykorzystane do formalnej syntezy tienamycyny opublikowanej w 2016r. w *Journal of Antibiotics* autorstwa Soluch, Grzeszczyk, Chmielewski i Furman. Kluczowa transformacja w cytowanej publikacji to reakcja enancjomerycznej pochodnej terminalnego acetyleny z pięcioczłonowym nitronem o konfiguracji *L-treo* w reakcji Kinugasy. Pięcioczłonowy nitron otrzymuje się z pochodnej dibenzylowej 2-deoksy-D-rybozy. Odmienne

podejście syntetyczne do budowy pierścienia β -laktamowego zaproponowano w grupie Tufariello w roku 1979. Kluczowe jest otrzymanie pochodnej izoksazolidyny w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji, 1,3-DCA, krotonianu metylu z pięcioczłonowym niepodstawionym nitronem, który po wodorolizie wiązania *N-O*, zabezpieczeniu grupy hydroksylowej i na końcu cyklizacji z użyciem bromku etylomagnezowego otrzymuje się β -laktam. W obu omawianych wyżej syntezach otrzymano β -laktam o trzech centrach stereogenicznych, w których konfiguracja jest tożsama z konfiguracją mostkowych atomów węgla tienamycyny,

d) Co to jest reakcja 1,3-DCA? – Rozdział czwarty zatytułowany *Reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji* (25 str.) zawiera cztery podrozdziały i jest najobszerniejszy w tej części pracy. Zawiera dużą dawkę informacji o 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronów zarówno do olefin jak i α,β -nienasyconych laktonów w aspekcie analizy przebiegu reakcji w obszarze kontroli kinetycznej i termodynamicznej, wpływu podstawników w obu reagentach na regio- i diastereoselektywność procesu. Autor podpira zgodność cytowanych wyników eksperymentalnych teoretyczną analizą reakcji cykloaddycji wykonaną przez Stecko. Literatura cytowana w tym fragmencie liczy ponad 40 pozycji. Wiele cytowanych odnośników to dotychczas udokumentowany publikacjami dorobek Zespołu II.

Rozdział zatytułowany *Badania własne* (40 str.) to nic innego jak opis zmagania Autora w osiągnięciu zamierzonego celu. Autor pełną garścią korzysta z dotychczasowych czterdziestoletnich doświadczeń Zespołu II w użyciu substratów cukrowych do syntezy docelowej.

A realizowane cele to:

a) sprawdzenie użyteczności reakcji 1,3-DCA enancjomerycznie czystych: cyklicznego nitronu **16** i α,β -nienasyconych pięcio- i sześcioczłonowych laktonów. Otrzymuje je z naturalnych źródeł cukrowych (D-mannitolu, D-glukozy, D-galaktozy oraz 2-deoksy-D-rybozy) oraz L-seryny i furfuralu, gdzie ten ostatni pozyskiwany jest z surowca naturalnego, otrąb, bogatych w pentozany. Wynikami tych badań eksperymentalnych Doktorant określił wpływ podstawników i konfiguracji substratów na skuteczność i kierunek indukcji asymetrycznej w badanym procesie. W otrzymanych pochodnych izoksazolidyny określał konfigurację względną nowoutworzonych centrów stereogenicznych (jest ich trzy) z wykorzystaniem techniki MRJ widm protonowych i pomiaru efektu NOE diagnostycznych sygnałów rezonansowych obecnych w widmie. Po pierwszym czytaniu tego fragmentu rozdziału chciałam pochwalić Doktoranta za wykorzystanie „odnalezionych”, czytaj wyznaczonych,

stałych sprzężenia 3J protonów wicynalnych nowoutworzonych centrów stereogenicznych, podparte obrazem widm $^1\text{HNMR}$ (str. 73 i 74) i za podaną metodykę do określenia ich konfiguracji. Niestety nie odnalazłam potwierdzenia wielkości stałych sprzężenia 3J protonów mostkowych nowoutworzonych centrów stereogenicznych w części eksperymentalnej opisującej widma MRJ analizowanych produktów (str. 114 i 115). Skąd ta rozbieżność?

b) wykorzystanie otrzymanych cykloadduktów, pochodnych izoksazolidyny, w formowaniu pierścienia β -laktamu. To najlepiej napisany fragment badań własnych. Doktorant opracował wydajną syntezę na sposób „one pot” poprzez: reduktywne rozcięcie wiązania *N-O* cynkiem w pochodnej izoksazolidyny, zabezpieczenie grupy hydroksylowej TBDPSCI i wewnątrzcząsteczkowe *N*-acylowanie z wytworzeniem pierścienia β -laktamu. Zarówno podstawnik przy atomie C-6 jak i podstawniki przy atomach C-2 i C-3 mają zdefiniowaną konfigurację. Te podstawniki są prekursorami podstawników znanych dla tienamycyny czy jej analogów. Co więcej, dla pochodnych izoksazolidyny otrzymanych z nienasyconego pięcioczłonowego laktonu, Doktorant otrzymał karbapenamę o konfiguracji mostkowych centrów stereogenicznych zgodnych z tienamycyną, aczkolwiek z umiarkowaną wydajnością 23-24% (produkty oznaczone numerami **203** i **205**). Ten fragment pracy zasługuje na wyróżnienie.

Pytanie do Doktoranta: Dlaczego na str. 88 chwali się Pan powodzeniem w otrzymaniu produktów **198** i **201**? Z punktu widzenia syntezy tienamycyny produkty **203** i **205** są atrakcyjniejsze.

c) synteza formalna tienamycyny, zrealizowaną na dwa sposoby. W pierwszym podejściu syntezy formalnej tienamycyny, Autor wykorzystał dibenzylowy nitron **16** w reakcji 1,3-DCA z *trans*-krotonianem etylowym i otrzymał cykloaddukt **218**. Po walce stoczonej w poszukiwaniu warunków odbezpieczenia grup hydroksylowych w produkcie **218**, chemoselektywnego zabezpieczenia drugorzędowej grupy hydroksylowej mesyланem, następnie utlenieniu pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w warunkach opisanych przez Annelego i współpr. oraz następczą eliminacją mesyланu osiągnął cel – otrzymał produkt **229** pochodną karbapenemu. I tak zakończył pierwszą syntezę formalną przedmiotowego antybiotyku. W drugim podejściu syntezy formalnej tienamycyny, Doktorant bogaty we wcześniej zdobyte doświadczenia, otrzymał nitron **248**, który w cyklu transformacji użytych wcześniej, przekształcił w pochodne karbapenamu **87** i **258**. Otrzymanie ich zakończyło drugą syntezę formalną tienamycyny.

Po krótkim zwięzłym *Podsumowaniu* (1.5 str.) w rozdziale *Część eksperymentalna* (41 str.) Autor dokumentuje otrzymywanie produktów pośrednich i końcowych.

Próżno szukać rozdziału zatytułowanego *Cytowana Literatura*. Autor, odmiennie od przyjętego zwyczaju, cytowane pozycje literaturowe umieszcza w przypisie dolnym strony. Przyjął sposób znany nam z monografii March'a. Ułatwia to na bieżąco czytelnikowi weryfikowanie pozycji cytowań, ale „coś za coś” kłopot zaczyna się, gdy cytowania się powtarzają (Autor przypisał numery pozycjom cytowanej literatury) i wracamy do sytuacji znanej tj. weryfikowania ich poprzez szukanie stron pytając: gdzie to było? Wystarczyło w przypisie dolnym podać stronę, na której po raz pierwszy podano ten odnośnik. Liczba cytowanych pozycji literaturowych wynosi 93, ale wiele z nich to cytowania wielopozycyjne, zatem całkowita liczba cytowań przekracza liczbę 150.

Dla rzetelności recenzji odniosę się do uderzających nieścisłości i potknięć Autora. I tak:

- w wykazie skrótów brakuje co najmniej 25% skrótów użytych w tekście (PCC, PPTS, PNB, PMB, EE czy DBU),
- na str. 20 jest sformułowanie „...inhibitorami niekomeptencyjnymi..” powinno być niekompetycyjnymi,
- na str. 22 Autor pisze, że „... β -laktamazy są enzymami hydrolizującymi antybiotyki” jest to chyba za duże uogólnienie, jako że te enzymy rozkładają tylko antybiotyki β -laktamowe. Natomiast nie hydrolizują tetracyklin, erytromycyny czy chloramfenikolu, a to wszak także antybiotyki,
- str. 23 nazwy gatunkowe w nazwach łacińskich piszemy małą literą zatem powinno być *Streptomyces cattleya* a nie *Streptomyces Cattleya*,
- na str. 23 (po raz pierwszy) Autor stosuje nazwę pół strukturalną „cystamina” poprawniej powinno być cysteamina,
- na str. 81 Doktorant stosuje termin „...podatnością na β -eliminację...” poprawniej by było użycie terminu 1,2-eliminację,
- często popełniany błąd interpunkcyjny, spotykany w pracach dyplomowych czy doktorskich, w języku polskim nie ma odstępów pomiędzy wielkością temperatury a jej jednostką podaną w Celcjuszach,
- i na koniec poprawne jest stosowanie terminu mała wydajność a nie niska wydajność.

Zarówno w opisie części literaturowej jak i opisie badań własnych, i to bez wyjątku, rażąco brak komunikacji pomiędzy tekstem a schematami i rysunkami. To swoista zemsta nad recenzentem. To bardzo utrudniało czytanie pracy. Brak podpisów pod schematami, (czego dotyczą?), również brak ich pod rysunkami, wymagało od recenzenta niejednokrotnie „gimnastyki” we wertowaniu wcześniejszych stron czy prowadzenia „śledztwa” gdzie to było i w jakich okolicznościach? Osobiście, Autor dysertacji przysporzył mi sporo pracy we

fragmencie śledzenia omawianych syntez i dyskusji otrzymanych wyników, a to również z braku wprowadzenia numeracji atomów węgla w analizowanych strukturach na rysunkach czy schematach (komunikacja). Nie był to chyba duży edytorski problem dla Autora. Wybitnie pomogłoby to w odbiorze treści pracy.

Wypunktowałam błędy w numeracji związków, przejęzyczenia, styl itp. na moim egzemplarzu pracy i przekazałam go Autorowi – jest ich sporo!

Jeśli już jesteśmy przy uwagach krytycznych dotyczących uchybień czy sformułowań żargonowych, to nie uniknął ich też Doktorant w *Części eksperymentalnej*. Zwyczajowo, a raczej zgodnie z rekomendacją edytorów czasopism z obszaru syntezy organicznej (ASC, Elsevier, Wiley) i wymogów stawianych pracom doktorskim, należało przyjąć jeden styl opisu w tej części i konsekwentnie go przestrzegać. Niestety, Autor pomieszał style opisu eksperymentów oraz zapomniał o regułach podania danych fizykochemicznych i spektralnych nieopisanych w literaturze związków.

Nie mam więcej uwag merytorycznych i formalnych.

Autor wykonał ogromną liczbę eksperymentów, wykazał umiejętność krytycznej analizy otrzymanych wyników i sformułował wnioski. Osiągnął cel, który postawił sobie na pierwszych stronach dysertacji. Zaprezentowany materiał literaturowy, dyskusyjny i doświadczalny spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.

Mgr Michał Pieczykolan jest współautorem siedmiu publikacji w renomowanych czasopismach chemicznych o znaczącym współczynniku prestiżu. W dwóch wykorzystano jego wyniki opisane w pracy doktorskiej. Ponadto, częściowe wyniki badań własnych prezentowane były na pięciu konferencjach międzynarodowych. Jest to dowód na to, że tematyka rozprawy doktorskiej jak i jej wyniki zostały uznane jako ważne, wnoszące istotny wkład w poszukiwaniu atrakcyjnych metod syntezy stereoselektywnej i docenione zostały przez innych opiniodawców.

Praca doktorska mgra Michała Pieczykolana spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Rzeszów, 15-12-2017 r.