

Prof. dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 20 kwietnia 2020 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anety Pindeli (*de domo* Suset)
***“Badania zjawiska tautomerii protonowej aminowo-iminowej i stereoizomerii
w pochodnych 4-amino-1,3-tiazol-2(5H)-onu”***

Przekazana mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Anety Pindeli (*de domo* Suset), zatytułowana “Badania zjawiska tautomerii protonowej aminowo-iminowej i stereoizomerii w pochodnych 4-amino-1,3-tiazol-2(5H)-onu”, przygotowana została w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pod opieką uznanego specjalisty w zakresie rentgenowskiej analizy strukturalnej związków organicznych Prof. Andrzeja Gzelli oraz w Zakładzie Krysztalów Molekularnych Instytutu Fizyki Molekularnej PAN w Poznaniu, pod opieką promotorską Prof. Andrzeja Łapińskiego uznanego badacza specjalizującego się w analizie struktury elektronowej metodami spektroskopii optycznej.

Struktura chemiczna cząsteczek substancji czynnej, występujące ich formy polimorficzne oraz potencjalne przemiany zachodzące *in vitro* i *in vivo* są kluczowe w określaniu możliwości oraz zakresu stosowania danej substancji w farmacji. Szczególnie istotne jest uwzględnienie w ocenie własności fizykochemicznych zdolności do występowania danej substancji czynnej w formach tautomerycznych, które mogą modulować jego aktywność. Pomimo, że zjawisko tautomerii znane jest od XIX wieku to nadal stanowi ciekawy i ważny temat badawczy z punktu widzenia aktywności biologicznej i zastosowań medycznych. W dobie coraz powszechniej stosowanych technik wirtualnych badań przesiewowych (*virtual screening*) i modelowania farmakoforów, rozpoznanie form tautomerycznych występujących w ciele stałym pozwala na bardziej trafny wybór potencjalnych substancji czynnych. Rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Anetę Pindelę doskonale wpisuje się w ten nurt badań.

Jako przedmiot swoich badań mgr Pindela wybrała serię 14 związków obejmujących pochodne 4-amino-1,3-tiazol-2(5H)-onu oraz ich prekursory stosowane w syntezie. W tym miejscu warto pochwalić kompleksowy, z punktu widzenia potencjalnych zastosowań farmaceutycznych, dobór modyfikacji badanego układu oraz spektrum zastosowanych metod badawczych.

Rozprawa doktorska, którą otrzymałem do oceny została zredagowana w klasycznej formie, czyli obszernego maszynopisu o objętości 252 stron, który Autorka podzieliła na piętnaście rozdziałów. Manuskrypt dysertacji zilustrowany został 198 rysunkami oraz 31 tabelami.

Pierwszy rozdział Autorka poświęciła szerokiemu omówieniu zjawiska tautomerii, gdzie przytoczyła zarówno dane dotyczące historii badań tego zjawiska jak i aktualne prace. Szczegółowo opisała różnice pomiędzy zjawiskiem mezomerii i tautomerii, a dane te opatrzyła odpowiednimi przykładami. W dalszej części mgr Pindela omówiła podział tautomerii i przedstawiła jej rodzaje, takie jak: kationotropię, anionotropię, tautomerię pierścieniowo-łańcuchową, tautomerię walencyjną i inne, bogato dokumentując je przykładami. Szeroko zaprezentowała także, związaną z tematyką rozprawy, tautomerię protonową występującą w związkach heterocyklicznych.

W drugim rozdziale Autorka skupiła się na przedstawieniu problematyki tautomerii w związkach biologicznie czynnych, omawiając to zjawisko na przykładach tautomerii protonowej aminowo-iminowej substancji farmaceutycznych. W mojej ocenie dogłębny i szeroki opis zjawiska tautomerii, jaki Autorka zaprezentowała we wstępie teoretycznym, warto rozważyć w przyszłości jako część pracy przeglądowej.

W rozdziale trzecim mgr Pindela zdefiniowała cel badań, podkreślając także współpracę Prof. Gzelli, promotora tej pracy, z grupą Prof. Lesyka z Lwowskiego Narodowego Uniwersytetu Medycznego (Ukraina), która zaowocowała dostępem do materiału badawczego. Warto podkreślić, że badania tej ważnej grupy związków mają już historię związaną zarówno ze wspomnianą współpracą jak i pracami badawczymi w Zakładzie Chemii Organicznej realizowanymi pod opieką Prof. Gzelli. W mojej ocenie rozdział ten jest nieco zbyt obszerny, aczkolwiek można zrozumieć intencje autorki aby przedstawić cel badań w kontekście realizowanej w grupie badawczej współpracy oraz wykonanych wcześniej badań podobnych układów.

Jako główny cel swoich badań, znajdujący też odzwierciedlenie w tytule rozprawy, mgr Pindela wybrała analizę zjawiska tautomerii protonowej aminowo-iminowej 4-feniloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu, jego pochodnych oraz związków stosowanych jako prekursorzy w syntezie – 4-tiokso-1,3-tiazolidyn-2-onu (izorodanina) oraz 4-amino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu. Wybór pochodnych obejmował podstawienia grupami elektrono-donorowymi (hydroksylową, metoksylową) w pozycjach *orto*, *meta* i *para* oraz elektrono-akceptorowymi (trifluorometylową oraz wybranymi halogenami) w *meta* i/lub *para* pierścienia fenyłowego. Dobór tej grupy związków związany jest też z faktem, że wszystkie te związki cechuje podatność na zajście zjawiska tautomerii protonowej. Pobocznym celem badań była też analiza stereochemii badanych molekuł, która wiąże się ze zjawiskiem tautomerii protonowej aminowo-iminowej oraz badania polimorfizmu kryształów badanych związków uzyskiwanych z rozpuszczalników o zróżnicowanej polarności.

W rozdziale czwartym mgr Pindela przedstawiła warsztat badawczy, jaki zastosowała do realizacji zdefiniowanego powyżej celu pracy. W szczególności skupiła się na preparatyce kryształów do badań rentgenograficznych, parametrach pomiaru dyfrakcyjnego oraz szczegółach obliczeniowych związanych z rozwiązywaniem i udokładnieniem struktur badanych

kryształów. Do badań wykorzystano łącznie 17 kryształów (wliczając różne formy polimorficzne lub kryształy pochodzące z odmiennych środowisk krystalizacji). Pomiary wykonywano głównie w temperaturze 130 K. Wyjątkiem jest polimorf pierwszy związku nr 1, dla którego pomiary dyfrakcyjne wykonano w temperaturze pokojowej. Opis warunków eksperymentalnych dopełnia precyzyjne omówienie warunków pomiarowych eksperymentów z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni i Ramana, spektroskopii elektronowej oraz informacja o zleconych pomiarach metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (^1H i ^{13}C NMR). W mojej ocenie przedstawione szczegółowe dane wykonywanych eksperymentów są wyczerpujące i pozwalają na odtworzenie i weryfikację opisywanych badań.

Rozdział piąty rozprawy obejmuje obszerne omówienie wyników badań strukturalnych izorodaniny, 4-amino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu, 4-fenyloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu i jego pochodnych, które zaprezentowano w 4 kolejnych podrozdziałach. Przedstawione w pierwszych dwóch podrozdziałach wyniki badań strukturalnych opublikowane zostały w pracach współautorskich. Pozycje atomów wodoru przy atomie azotu N7 wyznaczone były na podstawie analizy różnicowej mapy Fouriera i udokładniane z izotropowym czynnikiem temperaturowym. Obecność konkretnej formy tautomerycznej Autorka weryfikowała poprzez analizę schematu wiązań wodorowych oraz metodami spektroskopowymi. Do analizy oddziaływań międzycząsteczkowych charakteryzujących poszczególne układy wykorzystano analizę powierzchni Hirshfelda. Wykonane komplementarne badania metodami spektroskopii w podczerwieni oraz rozpraszania Ramana wsparte badaniami NMR wybranych układów, pozwoliły niezależnie wykazać obecność określonych form tautomerycznych.

W rozdziale szóstym Autorka skupiła się na analizie wpływu polarności rozpuszczalnika (w zakresie momentu dipolowego od 0 do 3,8) na strukturę elektronową wybranych pochodnych 4-fenyloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu. Badania metodą spektroskopii UV/Vis przeprowadziła w benzenie (rozpuszczalnik hydrofobowy, niepolarny), metanolu (rozpuszczalnik protyczny, polarny) i dimetyloformamidzie (rozpuszczalnik aprotyczny, polarny). Analizy uzyskanych widm doświadczalnych wsparte obliczeniami kwantowo-mechanicznymi wykonane metodą TD DFT wykazały, że cząsteczki związków 2-14 zachowują wyjściową formę tautomeryczną (aminową) bez względu na charakter rozpuszczalnika, co również potwierdza trwałość tej formy w tej grupie związków.

W następnej części Doktorantka przeprowadziła obliczenia kwantowo-mechaniczne dla 4-fenyloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu (związek nr 3), które uzupełniły wyniki eksperymentalne analizy zjawiska tautomerii protonowej aminowo-iminowej. Badania te opisane zostały w rozdziale siódmym, gdzie Autorka przede wszystkim skupiła się na analizie energii aktywacji przejść pomiędzy aminową a iminową formą tautomeryczną oraz przeprowadziła analizy struktury oscylacyjnej dla rozważanych form tautomerycznych związku nr 3. Kompleksowe podejście obliczeniowe dopełnia analiza struktury elektronowej 4-fenyloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu, określenie parametrów przejść elektronowych oraz prezentacja schematu orbitali molekularnych dla analizowanych form tautomerycznych (B1-B5) związku nr 3.

Rozdział ósmy dysertacji mgr Pindeli obejmuje opis wyników badań nad przestrzennym rozkładem substancji czynnej w danej formie tautomerycznej w gotowej postaci leku. Na badania te złożyły się analiza rozkładu przestrzennego składników tabletki badana przy użyciu rozpraszania ramanowskiego, analiza wielkości ziaren i ich rozkładu przestrzennego oraz ocena wpływu wielkości ziaren substancji czynnej i komponentów pomocniczych na jakość produktu leczniczego.

W rozdziale dziewiątym Autorka podsumowała wykonane w ramach rozprawy badania, podkreślając najważniejsze uzyskane wyniki. Natomiast bardzo szczegółowe wnioski wypływające z przeprowadzonych badań mgr Pindela zawarła w rozdziale dziesiątym.

Kolejne dwa rozdziały zawierają streszczenie w języku polskim (rozdział 11) i w języku angielskim (rozdział 12). W rozdziale czternastym Autorka zamieściła bogaty wykaz literatury zacytowanej w rozprawie, liczący bowiem 183 pozycje. Pracę zamykają wykazy rycin oraz tabel zamieszczonych w rozprawie oraz wykaz dorobku naukowego Autorki.

Zasadniczo, podczas lektury całego manuskryptu nie nasunęły mi się zastrzeżenia dotyczące wybranej przez Autorkę metodologii, nie mam też istotnych uwag krytycznych dotyczących uzyskanych wyników, ich sposobu prezentacji i interpretacji. Jednak z obowiązku recenzenta chciałbym poruszyć kwestię, która nasunęła mi się w trakcie lektury rozdziału ósmego, obejmującego istotne, z punktu widzenia farmacji, oszacowania przestrzennego rozkładu substancji aktywnej występującej w określonej formie tautomerycznej. Autorka skupiła się tu wyłącznie na wykorzystaniu dostępnych technik spektroskopii FTIR czy rozpraszania Ramana. Istnieje jednak szereg innych metod fizykochemicznych pozwalających na przeprowadzenie tego typu dociekań (jak np. mikrodyfrakcja czy mikroskopia IR z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego). Oczekiwałam więc w dyskusji zaprezentowanych w tym rozdziale wyników na tle innych badań analizy rozkładu 3D substancji czynnej i szerszego uzasadnienia motywacji wybranych przez Autorkę metod.

Podsumowując tę część mojej recenzji, chciałbym pokreślić, że mgr Pindela, w mojej ocenie, zrealizowała założone cele badawcze. Trafnie dobrała warsztat badawczy, który wykorzystwała do ich realizacji, obejmujący zarówno różne techniki spektroskopowe, rentgenowską analizę strukturalną oraz techniki obliczeniowe.

W mojej ocenie do głównych osiągnięć pracy należ zaliczyć:

- potwierdzenie metodami krystalografii rentgenowskiej, że badane układy to: 4-tiokso-1,3-tiazolidyn-2-on (związek nr 1), 4-amino-1,3-tiazolidyn-2-on (2), (Z)-4-fenylamino-1,3-tiazolin-2-on (3), (Z)-4-(2-hydroksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (4), (Z)-4-(3-hydroksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (5), (Z)-4-(4-hydroksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (6), (Z)-4-(2-metoksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (7), (Z)-4-(3-metoksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (8), (Z)-4-(4-metoksyfenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (9), (Z)-4-(3-trifluorometylofenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (10), (Z)-4-(4-trifluorometylofenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (11), (Z)-4-(4-fluorofenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (12), (Z)-4-(4-chlorofenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (13), (Z)-4-(4-bromoofenylo)amino-1,3-tiazolin-2-on (14);

- niezależnie od badań rentgenograficznych określenie formy tautomerycznej badanych związków metodami spektroskopowymi, wykazanie dużej trwałości aminowej formy tautomerycznej oraz stwierdzenie, że na zjawisko tautomerii nie ma wpływu wprowadzenie podstawników w pierścieniu fenylowym;
- analizę schematu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, stabilizujących określoną formę tautomeryczną;
- potwierdzenie przewidywanych form tautomerycznych w oparciu o obliczenia kwantowo-mechaniczne.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa przedłożona przez mgr Anetę Pindelę od strony graficznej przygotowana została bardzo starannie, a manuskrypt napisany poprawnym językiem fachowym. Jednakże, co wcześniej wspomniałem, niektóre fragmenty pracy są w mojej ocenie opisane zbyt obszernie, co jednak nie umniejsza wartości naukowej samej rozprawy. Rysunki ilustrujące omawiane struktury lub zjawiska zostały przez Autorkę drobiazgowo przygotowane, są więc czytelne i treściwe. Błędy edytorskie w manuskrypcie (tzw. literówki) są raczej nieliczne i nie obniżają ogólnej dobrej oceny pracy.

Podsumowanie

Reasumując, chciałbym podkreślić, że mgr Pindela dogłębnie przeanalizowała zjawisko tautomerii protonowej aminowo-iminowej 4-amino-1,3-tiazol-2(5H)-onu i jego pochodnych. Wykorzystała do tego celu szereg komplementarnych metod fizykochemicznych, a badania przeprowadziła zarówno dla fazy stałej jak i ciekłej. Widoczna jest biegłość Autorki w doborze metod badawczych w celu rozwiązania postawionego problemu naukowego. Nie budzi zastrzeżeń prezentacja uzyskanych wyników oraz ich interpretacja jak i krytyczna dyskusja. Część wyników została już opublikowana lub zaprezentowana na konferencjach naukowych, uważam jednak, że pozostałe wyniki w pełni zasługują na publikację w dobrych czasopismach branżowych.

W podsumowaniu stwierdzam więc, że przedstawiona przez mgr Anetę Pindelę rozprawa doktorska *“Badania zjawiska tautomerii protonowej aminowo-iminowej i stereoizomerii w pochodnych 4-amino-1,3-tiazol-2(5H)-onu”* spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora oraz wymagania zwyczajowe. Przedkładałam tedy wniosek do Rady Dyscypliny Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego o dopuszczenie mgr Anety Pindeli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Kozak
(---)