

Prof. UAM dr hab. Lech Celewicz  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Chemii  
Zakład Chemii Medycznej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8  
61-614 Poznań

Poznań, 5 września 2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Matkowskiej  
zatytułowanej „4-*N*-podstawione pochodne 5-azacytozyny – synteza, struktura i  
właściwości chemiczne”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Aleksandry Matkowskiej została wykonana pod kierunkiem Prof. dr. hab. Wojciecha T. Markiewicza (promotor) i dr. Bartosza Marciniaka (promotor pomocniczy) w Zakładzie Biologii Chemicznej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Praca dotyczy opracowania metod syntezy 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny jako potencjalnych inhibitorów metylotransferazy DNA typu pierwszego (ang. DNA methyltransferase 1, DNMT1) mogących znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej oraz technologii indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. induced pluripotent stem cells, i-PSC). Należy zauważyć, że fragment 5-azacytozyny zawierają dwa leki przeciwnowotworowe zatwierdzone przez *United States Food and Drug Administration (US FDA)* 5-azacytydyna i 5-aza-2'-deoksycytydyna (decytabina). Cechuje je jednak wysoka toksyczność w stosunku do zdrowych komórek i brak trwałości związany z łatwym rozpadem ich pierścienia triazynowego pod wpływem ataku reagentów nukleofilowych, w tym wody, na pozycję C-6.

Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Matkowskiej liczy 187 stron i składa się z trzech głównych segmentów: „Części literaturowej” (str. 6-49) poprzedzonej wykazem skrótów i oznaczeń (str. 1-3) oraz wstępem i celem pracy (str. 4-5), części: „Wyniki i dyskusja” (str. 50-102), po której następuje podsumowanie i wnioski (str. 103-105) oraz „Części eksperymentalnej” (str. 106-165). Pracę zamyka streszczenie w języku angielskim (str. 166-167) i bibliografia (str. 168-187) obejmująca 212 pozycje literaturowe. Rozprawa jest zatem zbudowana w sposób tzw. klasyczny z dosyć dobrym zachowaniem proporcji pomiędzy poszczególnymi częściami.

W części literaturowej Doktorantka omówiła proces metylacji DNA skupiając głównie swoją uwagę na metylacji reszt cytozynowych w pozycji C-5. Przedstawiony został mechanizm reakcji metylacji reszt cytozynowych katalizowany przez metylotransferazy DNA (DNMT) przy udziale *S*-adenozylometioniny (SAM) jako donora grupy metylowej. Dokonując przeglądu inhibitorów metylotransferaz DNA (Tabela 1, str. 15-17) Doktorantka pominęła ważny analog nukleozydowy 5,6-dihydro-5-aza-2'-deoksycytdnę, który charakteryzuje się mniejszą toksycznością w stosunku do zdrowych komórek i większą stabilnością niż 5-aza-2'-deoksycytdyna [H. Mertlikova-Kaiserova *et al.*, *Epigenetics*, **6**, 769-776 (2011)]. W dalszym ciągu przeglądu literaturowego, zostały zaprezentowane metody syntezy 4-*N*-podstawionych pochodnych cytozyny, zarówno te opierające się na generowaniu dobrych grup odchodzących w pozycji 4 pierścienia pirymidynowego, np. 2'-deoksyurydyny z grupami ochronnymi na funkcjach 3' oraz 5'-hydroksylowych, a następnie reakcji tak aktywowanych związków pośrednich z aminami, jak i te polegające na reakcji cytozyny lub jej pochodnych z aldehydami z utworzeniem zasad Schiffa, które dalej były poddawane redukcji. Przystawione też zostały metody otrzymywania pochodnych cytozyny z wybranymi podstawnikami w pozycji 5, takimi jak hydroksymetylowy (wprowadzany na drodze reakcji formaldehydu z cytozyną w warunkach zasadowych), formylowy, karboksylowy, metyloaminowy (wprowadzany na drodze reakcji Mannicha), podstawniki alkilowe (transformacja 5-alkilouracyli do 5-alkilocytozyn), hydroksylowy i aminowy. Następnie zostały omówione metody syntezy 5-azacytozyny i jej pochodnych oparte na budowie pierścienia 1,3,5-triazynowego z wykorzystaniem dwóch komponentów łańcuchowych, jednym z nich był guanylomocznik, a drugim dimetyloacetal dimetyloformamid, ortomrocjan etylu (zastosowanie ortoocjanu lub ortopropionianu etylu prowadziło do uzyskania 6-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny), czy też octan formamidyny. Przedstawiono także przykładową metodę syntezy 5-azacytozyny, w której związkiem wyjściowym był chlorek cyjanurowy (2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyna). Ostatnie poruszone zagadnienia w części literaturowej pracy to tautomeria iminowo-enaminowa w aminopirymidynach i amino-1,3,5-triazynach oraz rotameria aminopodstawionych 1,3,5-triazyn.

Chociaż generalnie uważam, że część literaturowa pracy opracowana jest dobrze, to jednak pojawia się w niej szereg drobnych błędów i nieścisłości jak na przykład:

- na str. 8 (Schemat 2) w skrótowym oznaczeniu *S*-adenozylometioniny zamiast Ade powinno być A lub Ado dla oznaczenia reszty adenozy (Ade oznacza adeninę),

- na str. 17 (Tabela 1) w wzorze związku **12** brakuje wiązania podwójnego w grupie ftalimidowej,
- na str. 17, jest „trifosforanów deoksynukleotydów”, natomiast powinno być „5'-trifosforanów 2'-deoksynukleozydów”,
- na str. 20, jest „co pozwala na zastosowanie jej jako potencjalny inhibitor tego enzymu”, natomiast powinno być „co pozwala na zastosowanie jej jako inhibitora tego enzymu”,
- na str. 21 (Schemat 4) brak wyjaśnienia jakie grupy ochronne zastosowano, podobnie na innych schematach (np. nr 6 i 7),
- na str. 24 (Schemat 8) jest „2'-deoksyryboza”, natomiast powinno być „2-deoksyryboza”, podobny błąd występuje na innych schematach,
- na str. 27 (Schemat 13) grupa benzylova ma skrótowe oznaczenie Bnz, natomiast ogólnie przyjęte jest Bn,
- na str. 28 (Schemat 14) jest CH<sub>3</sub>COH, natomiast powinno być CH<sub>3</sub>CHO, podobnie w przypadku dwóch kolejnych aldehydów,
- na str. 31 (Tabela 2) w przypadku związków **35-37** podstawnik R<sup>1</sup> powinien mieć „przerwane” wiązanie podwójne, np. CH<sub>3</sub>CH= dla związku **35**,
- na str. 33 (Schemat 17) w wzorze związku **52** brakuje wiązania podwójnego,
- na str. 40 Schematy 26 i 27, z uwagi na duże podobieństwo, mogłyby zostać zastąpione jednym wspólnym.

W części dysertacji zatytułowanej „Wyniki i dyskusja” Doktorantka przedstawiła własne opracowania syntez 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny oparte na czteroetapowym schemacie. Związkiem wyjściowym w tych syntezach był chlorek cyjanurowy (2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyna), który w pierwszym etapie był przekształcany w 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę, w specyficznych warunkach, pod działaniem metanolu w obecności wodorowęglanu sodu we wrzącej mieszaninie reakcyjnej zawierającej chloroform w takiej samej objętości jak metanol. Warunki prowadzenia tej reakcji zostały zaczerpnięte z pracy Prof. Z. Kamińskiego w *Peptide Science*, **55**, 140-164 (2000) i w porównaniu do innych podobnych metod zapewniają wysoką wydajność (81-91%) tworzenia pożądanego produktu. W drugim etapie syntezy, 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyna została poddana reakcji hydrodehalogenacji z użyciem wodoru generowanego z borowodoru sodu i kwasu siarkowego(VI) w obecności katalizatora palladowego osadzonego na węglu aktywnym (Pd/C, 10%) w roztworze tetrahydrofuranu lub eteru dietylowego z dodatkiem

trietyloaminy. Warunki prowadzenia reakcji hydrodehalogenacji zostały starannie dobrane, albowiem 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna została otrzymana z wydajnością 98%. W tym miejscu mam pytanie do Doktorantki, czy próbowała używać jako wygodnego źródła wodoru mrówczanu amonu w reakcji katalitycznej hydrodehalogenacji 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny? W trzecim etapie syntezy, 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna została poddana reakcji aminolizy z użyciem następujących amin: metyloaminy, dimetyloaminy, furfuryloaminy i benzyloaminy w etanolu w temperaturze pokojowej. 2-Metoksy-4-metyloamino-1,3,5-triazynę otrzymano z 98% wydajnością już po 2 godzinach prowadzenia reakcji, natomiast pozostałe produkty aminolizy wyodrębniono z ponad 90% wydajnością dopiero po 24 godzinach. W czwartym etapie syntezy, przeprowadzono „odmetylowanie” związków otrzymanych w etapie trzecim (użyłbym raczej sformułowania *O*-demetylowanie, aby wykluczyć drugą możliwość *N*-demetylowania). Pragnę podkreślić, że ten etap syntezy został bardzo dobrze rozpracowany przez Doktorantkę. W pierwszym podejściu do rozszczepienia grupy 2-metoksy został użyty kwas chlorowodorowy, jednak w przypadku 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny reakcja nie zakończyła się sukcesem, z uwagi na brak trwałości pierścienia furanowego w warunkach kwasowych. Lepsze rezultaty uzyskano stosując generowany *in situ*, z chlorku trimetylosililu i jodku sodu w acetonitrylu, jodek trimetylosililu. Jednak, w tym przypadku, powstający w reakcji rozszczepienia grupy 2-metoksy jodek metylu powodował powstawanie dodatkowego produktu pochodnej *N*-1 metylowej 4-*N*-podstawionej 5-azacytozyny. Doktorantka zdecydowała się na użycie samego chlorku trimetylosililu w acetonitrylu do przeprowadzenia *O*-demetylowania pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny uzyskując czysty przebieg reakcji i wysokie wydajności (88-93%) 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny. Zachęcona skutecznością działania chlorku trimetylosililu w reakcji *O*-demetylowania 4-*N*-podstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny Doktorantka przeprowadziła systematyczne badania reakcji *O*-demetylowania na jeszcze dwóch dodatkowych pochodnych 1,3,5-triazyny: 2-metoksy-4-amino-1,3,5-triazynie i 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynie, a także 2,4-dimetoksy-pyrimidynie, 2-metoksy-pirydynie i anizolu. *O*-Demetylowanie wymienionych powyżej pochodnych 1,3,5-triazyny zachodziło w znaczącym stopniu już w ciągu 8 godzin (z wydajnością odpowiednio 79 i 98%), 2,4-dimetoksy-pyrimidyna ulegała przekształceniu w uracyl z 80% wydajnością w ciągu 24 godzin, w tym samym czasie 2-metoksy-pirydyna ulegała przemianom w 2-pirydon zaledwie z 40% wydajnością, natomiast anizol nie ulegał reakcji.

Doktorantka otrzymała także serię pochodnych 5-azacytozyny podstawionych w pozycji *N*-1 prowadząc reakcje 4-*N*-furfurylo-5-azacytozyny i 5-azacytozyny z różnymi halogenkami

organicznymi w obecności wodoroku sodu w dimetyloformamidzie w temperaturze 100 °C. W pozycję N-1 pierścienia 5-azacytozyny zostały wprowadzone następujące podstawniki: metyl, benzyl, metoksymetyl, metoksyetyl, a także na innej drodze tetrahydropiranyl (w wyniku reakcji 5-azacytozyny z octanem tetrahydro-2H-piran-2-ylu w obecności *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamidu (BSA) i triflanu trimetylosililu). W nawiązaniu do znanej z literatury podatności 5-azacytydyny i 5-aza-2'-deoksycytydyny (decytabiny) do ulegania reakcji otwarcia pierścienia 5-azacytozynowego w wyniku ataku reagentów nukleofilowych na pozycję C-6 z utworzeniem pochodnych guanylomocznika przeprowadzone zostały przez Doktorantkę rozległe badania trwałości otrzymanych N-1 podstawionych pochodnych 5-azacytozyny. Pochodne te zostały poddane działaniu mieszaniny 25% wody amoniakalnej, dioksanu i metanolu w stosunku objętościowym 1:1:1, a przebieg reakcji był kontrolowany metodą TLC i za pomocą spektrometrii mas (na podstawie stosunku sygnałów pochodzących od substratów i produktów). Jak przyznaje sama Doktorantka metoda spektrometrii mas nie za bardzo nadaje się do ilościowej kontroli przebiegu reakcji, zapewne lepsze rezultaty można byłoby uzyskać kontrolując kinetykę reakcji otwarcia pierścienia triazynowego pochodnych 5-azacytozyny z wykorzystaniem metody HPLC (czy też bardziej nowoczesnej UPLC). Tym nie mniej Doktorantka poczyniła cenne ustalenia dotyczące trwałości otrzymanych N-1 podstawionych pochodnych 5-azacytozyny wykazując, że podstawniki zawierające silnie elektroujemny ujemny atom tlenu ( $E = 3,5$ ), tj. metoksymetyl, metoksyetyl i tetrahydropiranyl wpływają na obniżenie trwałości tych pochodnych.

Posiadając już doświadczenie w zakresie syntezy pochodnych 1,3,5-triazyny Doktorantka poszerzyła bibliotekę otrzymanych związków o 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny. Związki te zostały otrzymane w wyniku reakcji 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny z aminami, użyto podstawowego składu amin: metyloaminy, dimetyloaminy, furfuryloaminy i benzyloaminy, w dichlorometanie w temperaturze pokojowej. Zsyntezowane 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny poddano ponownej reakcji aminolizy jednak reakcja nie zachodziła. Wobec tego, do syntezy pochodnych diaminowych 1,3,5-triazyny postanowiono wykorzystać inny substrat, 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę, co zakończyło się sukcesem. Jednak nie zdołano przeprowadzić reakcji *O*-demetylowania uzyskanych 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny zarówno przy użyciu chlorku trimetylosililu jak i generowanego *in situ* jodku trimetylosililu. W końcu do syntezy pochodnych diaminowych 1,3,5-triazyny użyto jako związku wyjściowego 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazynę (chlorek cyjanurowy), co pozwoliło otrzymać serię 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny, które

poddane reakcji hydrolizy przy użyciu wodorotlenku potasu w mieszaninie dioksanu i wody w temperaturze wrzenia uległy przemianom w 6-aminopodstawione pochodne 5-azacytozyny.

Dla wielu otrzymanych aminopodstawionych pochodnych 1,3,5-triazyny Doktorantka zaobserwowała, że sygnały w widmach  $^1\text{H}$  NMR, pochodzące od danej grupy protonów pojawiają się dwukrotnie, co zostało wyjaśnione zahamowaną rotacją wokół wiązania pomiędzy atomem węgla C-4 (lub C-6) pierścienia triazynowego, a aminowym atomem azotu. Zaobserwowane zjawisko rotamerii zostało potwierdzone poprzez wykonanie widm temperaturowych  $^1\text{H}$  NMR, w temperaturze 90 °C sygnały pochodzące od dwóch form rotamerowych ulegały koalescencji. Bariere rotacji oszacowano na podstawie obliczeń teoretycznych wykonanych za pomocą programu ORCA.

W powyżej omówionej części pracy „Wyniki i dyskusja” zauważyłem szereg drobnych błędów i nieścisłości jak na przykład:

- na str. 50, w zdaniu zaczynającym się od słów „Wcześniejsze badania [75] wskazywały na dwa związki: ...” określenie „(Rysunek 10)” pojawia się dwa razy, a wystarczy, żeby było użyte raz na końcu zdania,
- na str. 51, ostatnie zdanie jest niekompletne; opracowano czteroetapową syntezę, ale jakich związków?
- na str. 54 (Schemat 36), użyto niepoprawnie symbolu T zarezerwowanego dla temperatury bezwzględnej, a nie wyrażonej w skali Celsjusza,
- na str. 54 użyto niepoprawnego określenia „powstały osad zwirowałam”,
- na str. 60 jest „otrzymałam pochodną *N*-metylowaną”, powinno być „otrzymałam pochodną *N*-1-metylową”,
- na str. 60 jest zdanie: „Innym wyjaśnieniem może być konkurencyjna reakcja przegrupowania substratu.”; może Doktorantka zechciałaby wyjaśnić o jakie przegrupowanie chodzi?
- na str. 73 (Schemat 73) otwarcie pierścienia triazynowego 5-azacytydyny, czy też 5-aza-2'-deoksycytydyny powoduje przegrupowanie fragmentu rybofuranozylowego do rybopiranozylowego (powstaje anomer  $\alpha$  i  $\beta$  związku otwartołańcuchowego), patrz: Sowers L. C. *et al.*, *Chem. Res. in Toxicol.*, **22**, 1194-1204 (2009), odnośnik literaturowy [201],
- na str. 75 (podpis pod Schematem 49) „Odmetylowanie związków przy użyciu chlorotrimetylosilanu”, jakich związków?
- na str. 76, dlaczego Rysunek 25, a nie Schemat?

- na str. 82, nie chodzi o „diaminowe pochodne 5-azacytozyny” lecz monoaminowe pochodne 5-azacytozyny, a konkretnie o 6-aminowe pochodne 5-azacytozyny.

W części eksperymentalnej pracy Doktorantka precyzyjnie przedstawiła procedury otrzymywania nowych związków oraz podała ich charakterystykę spektroskopową:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i oraz MS. Strukturę 4-*N*-furfurylo-5-azacytozyny ustalono na podstawie badań metodą krystalografii rentgenowskiej. Generalnie, należy zauważyć, że z eksperymentalnej części rozprawy przebija solidny warsztat pracy.

Ogólnie chciałbym stwierdzić, że praca wykonana jest na wysokim poziomie badawczym, napisana jest starannie, dobrym językiem i czyta się ją z zainteresowaniem. Rozprawa jest dobrze opracowana pod względem graficznym, zawiera 49 rysunków, 58 schematy i 8 tabel.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Aleksandry Matkowskiej, z uwagi na liczne osiągnięcia badawcze o charakterze istotnych nowości naukowych, oceniam jako bardzo wartościową. Przedstawione uwagi krytyczne w znacznym stopniu tej oceny nie umniejszają. W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia w całej rozciągłości wymogi ustawy „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki”. W związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. UAM dr hab. Lech Celewicz

*Lech Celewicz*