

Warszawa, 2.06.2022 r.

Mgr Monika Wanat
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Autoreferat pracy doktorskiej zatytułowanej:

Applications of X-Ray Structural Analysis and Quantum Crystallography Methods in Studies of Crystals of Substances with Potential Pharmaceutical Importance

Tytuł w języku polskim:

Zastosowanie Rentgenowskiej Analizy Strukturalnej i Metod Krystalografii Kwantowej w Badaniach Kryształów Związków o Potencjale Farmaceutycznym

Promotorzy: prof. dr hab. Krzysztof Woźniak oraz prof. dr hab. Rafał Siciński

W badaniach farmaceutycznych analiza struktury aktywnych składników farmaceutycznych (API), i ich wzajemnego oddziaływania, ma kluczowe znaczenie ze względu na możliwość zwiększenia pozytywnych efektów działania leków, jak również zmniejszenia ryzyka związanego z możliwością pojawienia się skutków ubocznych. Badania strukturalne mają szerokie zastosowanie w badaniach farmaceutycznych, gdyż umożliwiają odkrywanie nowych form polimorficznych znanych związków lub analizę oddziaływań elektrostatycznych lub międzycząsteczkowych. Pozwala to na zrozumienie związku pomiędzy aktywnością biologiczną oraz powinowactwem ligandów do makromolekuł. Badania te mogą prowadzić do zaprojektowania nowych związków o bardziej pożądanym właściwościach biologicznych. Wiele badań strukturalnych związków farmaceutycznych jest jednak ograniczonych. Powodem jest często niewystarczająca jakość kryształów, które słabo rozpraszają promieniowanie rentgenowskie. Przekłada się to na niską jakość rentgenowskich danych dyfrakcyjnych oraz słabą jakość finalnej informacji strukturalnej i elektronowej. Krystalografia kwantowa (ang. *Quantum Crystallography*) pozwala na bardziej wnikliwą, ilościową analizę struktur i gęstości elektronowej kryształów oraz analizę oddziaływań elektrostatycznych. Wynika to z zastosowania bardziej zaawansowanych, asferycznych, modeli atomowych gęstości elektronowych w porównaniu do sferycznego modelu niezależnych atomów (ang. *Independent Atom Model*, IAM).

Moja praca doktorska poświęcona jest zastosowaniu krystalografii kwantowej w kontekście badań farmaceutycznych. W pierwszej części pracy wykonałam badania metodologiczne dotyczące zastosowania krystalografii kwantowej do udokładnień niskorozdzielczych ($d=0,8 \text{ \AA}$) danych rentgenowskich uzyskanych przy pomocy promieniowania $\text{CuK}\alpha$. Na podstawie uzyskanych wyników oceniłam, że wszystkie analizowane modele gęstości elektronowej, tj. ten uzyskany poprzez udokładnienie metodą atomów Hirshfelda (ang. *Hirshfeld Atom Refinement*, HAR), model przenaszalnych atomów asferycznych (ang. *Transferable Aspherical Atom Model*, TAAM) i model deformacyjnej gęstości elektronowej zorientowanej na wiązania (ang. *Bond-Oriented Deformation Density Model*, BODD) mogą zostać zastosowane w udokładnieniu niskorozdzielczych rentgenowskich danych dyfrakcyjnych. Bardziej precyzyjne i dokładne struktury końcowe zostały uzyskane za pomocą modeli HAR oraz TAAM. W swojej ocenie, odnosiłam się do danych pochodzących z dyfrakcji neutronów, które stanowiły dane

referencyjne. Niemniej jednak, gorsze rezultaty modelu BODD wynikają z jego założeń. Został on zaprojektowany tak, aby był szybszy i bardziej przyjazny dla użytkownika niż HAR i TAAM i uwzględniał główne efekty obecne w rozkładach gęstości elektronowej. Dlatego udokładniana jest mniejsza liczba parametrów niż w przypadku modeli HAR i TAAM. Różnice pomiędzy modelami HAR i TAAM w zakresie modelowania geometrii, ADPs oraz dopasowania modelu do gęstości elektronowej są mniejsze. Przewagą modelu HAR jest możliwość uzyskania kątów walencyjnych bliższych referencyjnych. W modelu tym mogą także być stosowane więzy na wiązaniach X-H, które są bliższe wartościom referencyjnym w przypadku modelu TAAM, w którym te więzy są stosowane. Wskazałam także, jakie efekty systematyczne występują w udokładnieniach danych niskorozdzielczych metodami krystalografii kwantowej. Najważniejsze błędy systematyczne to:

- Większe maksima i mniejsze minima dla resztkowych gęstości elektronowych w przypadku danych niskorozdzielczych w porównaniu z danymi wysokorozdzielczymi.
- Mniejsza szerokość wykresów fraktalnych danych niskorozdzielczych niż tych uzyskanych dla danych o wysokorozdzielczych.
- Wartości ADPs uzyskane na podstawie danych niskorozdzielczych są systematycznie większe niż te uzyskane na podstawie danych wysokorozdzielczych.

Kluczowy w mojej analizie jest wniosek, że te systematyczne efekty są związane z niewystarczającym zakresem informacji dostępnym w rentgenowskich danych niskorozdzielczych (niskokątowych). Błędy systematyczne w powszechnie stosowanym modelu IAM są związane głównie z niedoskonałościami zastosowanego modelu i jego sferycznym przybliżeniem atomowej gęstości elektronowej.

Druga część mojej pracy doktorskiej jest poświęcona badaniom strukturalnym analogów witamin D i ich produktów pośrednich z zastosowaniem metod krystalografii i krystalografii kwantowej. Zastosowanie modelu TAAM pozwoliło na wydłużenie długości wiązań do atomów wodoru, które są znacząco skrócone w przypadku zastosowania modelu IAM. Wyeliminowanie tego systematycznego efektu pozwoliło na przeprowadzenie obliczeń teoretycznych. Zastosowanie tego modelu pozwoliło mi także na wykonanie rekonstrukcji teoretycznej gęstości elektronowej analogów witamin D. Dodatkowo, przeprowadziłam udokładnienia wysokorozdzielczych danych rentgenowskich związków pośrednich w syntezie witamin D. Na ich podstawie wyznaczyłam ilościowy rozkład gęstości elektronowej. Do najważniejszych wyników, które uzyskałam należą:

- Wykazanie, że pierścień A w analogach witamin D może przyjmować konformację krzesłową α lub β . Większość analogów witamin D przyjmuje konformację β . Konformacja α została pierwszy raz wspomniana w 2001 roku, a samo zjawisko pozostało niewyjaśnione. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań strukturalnych oraz analizy struktur dostępnych w strukturalnej bazie danych Cambridge Structural Database (CSD) ustaliłam zależność, zgodnie z którą przyjmowana jest konformacja pierścienia A. Zauważyłam, że obecność bezpośrednich wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi 1-OH i 3-OH prowadzi do konformacji β . Ponadto, w przypadku gdy grupa hydroksylowa 1-OH nie występuje przyjęcie konformacji β jest nadal możliwe w obecności innej grupy hydroksylowej w pozycji ekwatorialnej, która zastępuje grupę hydroksylową 1-OH. Wiąże się to z niższą energią konformacji β niż α , dlatego konformacja β jest preferowana. Poparłam powyższe obserwacje obliczeniami teoretycznymi.

- Przeprowadziłam analizę oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych analogów witaminy D w sieci krystalicznej. Wykazałam, że pozycja grupy metylenowej w pierścieniu A silnie wpływa na układ wiązań wodorowych i wykazałam stabilizującą rolę tej grupy w jej naturalnym położeniu (C-10). Wyjaśnia to istotny wpływ pozycji grupy metylenowej na właściwości biologiczne związków końcowych.
- Pokazałam, że istnieje zależność pomiędzy oddziaływaniami i energią tych oddziaływań w sieciach krystalicznych finalnych analogów witamin D i ich produktów pośrednich. Pokazuje to, że na podstawie produktów pośrednich możliwe jest przewidywanie właściwości końcowych związków.
- Obliczyłam energię elektrostatyczną oddziaływań fragmentów analogów witamin D i całych cząsteczek w sieci krystalicznej. Dostęp do tych informacji nie byłby możliwy bez zastosowania metod krystalografii kwantowej. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazują możliwość zastosowania krystalografii i krystalografii kwantowej do analizy związków o potencjale farmaceutycznym. Jest to szczególnie istotne w przypadku, gdy kryształy tych związków słabo rozpraszają promieniowanie rentgenowskie i nie da się uzyskać wysokorozdzielczych danych rentgenowskich.

Dodatkowo, udowodniłam metodologiczną poprawność tego podejścia. Wykorzystanie metod krystalografii kwantowej do niskorozdzielczych danych związków o potencjale farmaceutycznym pozwoliło na wykonanie obliczeń energii dimerów oraz energii kulombowskiej, dyspersyjnej i całkowitej oddziaływań w sieci krystalicznej tych związków. Obliczyłam energię oddziaływań elektrostatycznych całych cząsteczek oraz ich poszczególnych fragmentów. Wszystkie uzyskane informacje mogą być wykorzystane do przewidywania struktury i projektowania leków.

Podsumowując, badania przedstawione w pierwszej części mojej pracy doktorskiej stanowią dowód metodologicznej poprawności stosowania metod krystalografii kwantowej do udokładnień niskorozdzielczych danych rentgenowskich. Ponadto, pozwalają na wskazanie błędów systematycznych, które występują w ostatecznych strukturach związków udokładnionych za pomocą tych metod. Badania te zostały opisane w dwóch oryginalnych publikacjach w czasopismach *Acta Crystallographica Section B* oraz *Molecules*. Badania naukowe przedstawione w drugiej części pracy dostarczyły nowych informacji z zakresu chemii witamin D. Stanowią praktyczny przykład, w którym metody krystalografii kwantowej umożliwiły dodatkowy wgląd w energię oddziaływań międzycząsteczkowych, właściwości topologiczne oraz rozkład gęstości elektronowej. Wyniki przeprowadzonych badań naukowych zostały opublikowane w trzech oryginalnych publikacjach w czasopismach *Crystal Growth & Design*, *Molecules*. We wszystkich pięciu publikacjach, które wchodziły w skład rozprawy doktorskiej, jestem pierwszym autorem.