



Prof. Marcin Dрамиński

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Dagmary Baraniak zatytułowanej: „Synteza koniugatów nukleozydów z alkaloidami kory chinowej z zastosowaniem metod chemii „click”.”

Przedstawiona do recenzji praca składa się z 276 stron wydruku komputerowego w formacie A4 z żywą paginacją stron. Praca została wykonana w Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem profesora UAM dr hab. Lecha Celewicz.

Praca zawiera 10 stron tytułowych i formalnych, streszczenie w języku angielskim (3 strony), precyzyjny spis treści (6 stron), wykaz używanych skrótów i symboli (7 stron), wstępu (4 strony), części literaturowej (100 stron), celu pracy (2 strony), dyskusji wyników (74 strony), części eksperymentalnej (51 stron), podsumowania (6 stron), wykazu cytowanej literatury (12 stron), wykazu własnych publikacji (1 strona).

Praca była finansowana z Grantu Promotorskiego Nr. N N204 154 240.

Mgr Dagmara Baraniak, zainteresowana chemią nukleozydów mających znaczenie jako leki, postanowiła przebadać pochodne nukleozydów z alkaloidami kory chinowej. Wytypowała pięć znanych z zastosowań farmakologicznych nukleozydów i cztery alkaloidy kory chinowej mających również historię zastosowań medycznych. Jakby to było mało w trakcie studiów literaturowych i prac laboratoryjnych rozwinęła projekty syntez o zagadnienia fosforylacji nukleozydów i alkaloidów. Po takim przygotowaniu, aby projekt pracy był logiczny należało wykorzystać możliwości połączenia każdego zaprojektowanego nukleozydu z każdym alkaloidem chinonowym – tak więc projekt rozwinął się do znacznych rozmiarów preparatywnych. Mimo to doktorantka potrafiła nie tylko wykonać zaprojektowane koniugaty ale jeszcze określić wstępnie ich wartość farmakologiczną oznaczając aktywność cytotoksyczną wobec hodowanych komórek ludzkich nowotworów. Po oznaczeniu wskaźnika hydrofobowości (logP) przedyskutowała obiecujące wartości  $IC_{50}$  w aspekcie możliwości przenikania nowych związków przez błony komórkowe.

Tak więc mgr D.Baraniak jest autorką bardzo obszernego preparatywnego opracowania syntezy nowych koniugatów nukleozydów z alkaloidami, które niejednokrotnie wykazują lepsze własności hamowania wzrostu komórek nowotworowych od łączonych związków wyjściowych. Zastosowanie we wielu przykładach nowoczesnego sposobu kondensacji azydów z alkinami katalizowanego  $Cu^+$ , wzorowanego na pracach K.B.Sharpleś'a (laureata nagrody Nobla z chemii w 2001r) jest dodatkowym walorem przedstawionego doktoratu. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane do projektowania użytecznych syntez prowadzących w perspektywie do nowych leków.

Dodatkowym zrealizowanym celem pracy jest oznaczenie własności fluorescencyjnych otrzymanych związków. Własności te mogą być użyteczne przy wykorzystaniu nowych związków jako sond przy badaniach pochodnych kwasów nukleinowych.

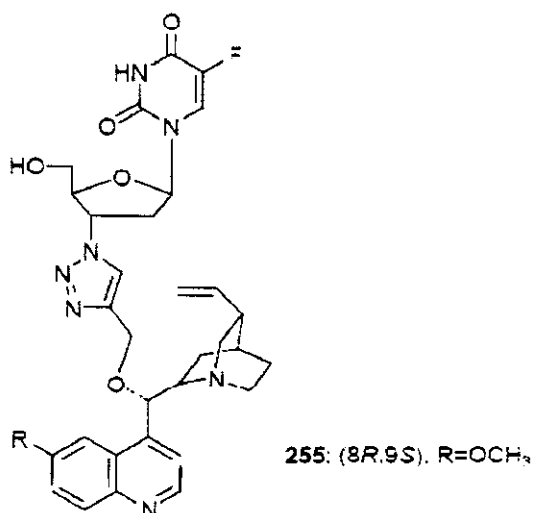
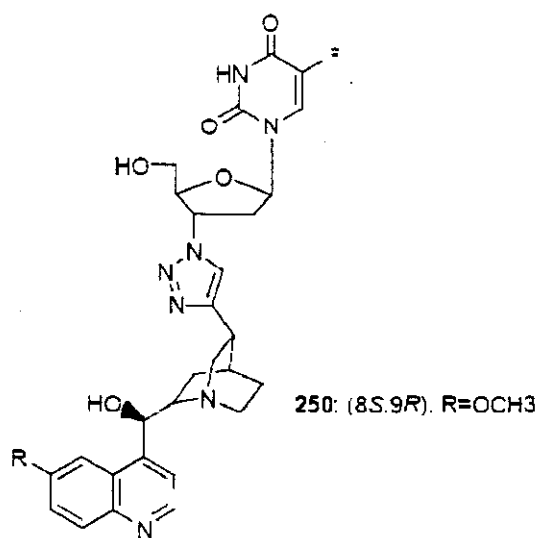
Te godne pochwały osiągnięcia w koncepcji i wykonaniu pracy nie przesłaniają solidnego warsztatu laboratoryjnego. Zaprojektowane nukleozydy o przeciwnowotworowych własnościach zawierające ugrupowanie  $-N_3$  – związki **1,5,38,56,74** - doktorantka otrzymała w wieloetapowych syntezach. Syntezy te zostały przeprowadzone w skali wielogramowej, gdyż plan otrzymania koniugatów tego wymagał. Już sam ten fragment pracy preparatywnej wykonany był z krytycznie precyzyjnym wyborem drogi postępowania.

Np. związek **38** był otrzymywany wg. dwóch sposobów Czerneckiego oraz Glińskiego. Doktorantka preferowała drugi sposób, wymagający dużo większego nakładu pracy laboratoryjnej. Z opisu wynika, że pierwszy sposób można zrealizować z wydajnością (0,90x030) ok. 27% (bez odblokowania) a drugi z wydajnością (0,52x0,72x0,86x0,85x0,94) 26% a więc z rezultatami porównywalnymi. Chyba że wystąpiły dodatkowe trudności o których doktorantka nie wspomina.

Alkaloidy kory chinowej również wymagały wstępnej modyfikacji – należało je wyposażyć w funkcję zawierającą wiązanie potrójne. Mgr D.Baraniak postanowiła wykorzystać dwie możliwości takiej modyfikacji. Wstępna praca urosła do syntezy ośmiu związków : **183,184,185,186,187,188,189,190**. Poza pochodnymi alkaloidów zawierających funkcję potrzebną do kondensacji z azydami (-CC-H uzyskiwaną drogą eliminacji) udało się otrzymać po fosforylacji fosforoamid z grupą propargilową – **226**.

Wszystkie te związki zostały użyte do konstrukcji koniugatów nukleozydowo-alkaloidowych. Koniugaty to : **234-241, 242-249, 250-257, 258-259, 260-262, 264-266** . Uzyskano również amidofosforany **229-233** nie zawierające składnika nukleozydowego i amidofosforany pochodne nukleozydów: **224-227** i **263**. Wymienione w tym akapicie związki przygotowano w ilościach umożliwiającym oznaczenie cytotoksyczności w hodowlach ludzkich komórek nowotworowych. Badanie to pozwoliło zwrócić szczególną uwagę na związki wykazujące IC<sub>50</sub> rzędu 1 µg/mL a więc związki aktywne. Są to : **230, 234, 243, 247, 250, 251, 255, 259, 260**. Otrzymanie tak znacznej liczby aktywnych połączeń jest znaczącym osiągnięciem doktorantki.

Szczególnie wyróżniają się pochodne **250** i **255** , zawierające 5-fluorouracyl, których IC<sub>50</sub> jest najmniejszy (0,13 i 0,85 µg/mL) i logP (0,40 i 2,16) prognozuje korzystne przenikanie tych związków przez bariery biologiczne.



Sądzę, że doktorantka powinna wykorzystać te obiecujące wyniki przy projektowaniu dalszych prac.

Drugą własnością użytkową którą sprawdzano jest wydajność kwantowa fluorescencji. Nowootrzymane związki posiadają możliwość łączenia z kwasami nukleinowymi i mogą znaleźć zastosowanie jako sondy fluorescencyjne. W tym kierunku badano związki: **183-184, 187-188, 234-235, 238-239, 242-247 i 250-255.**

Wszystkie opisywane związki pośrednie i uzyskane koniugaty mają prawidłowo udokumentowaną strukturę przez oznaczenie i opisanie wraz z interpretacją widm NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) oraz w miarę potrzeby MS.

Wnioski z uzyskanych rezultatów tak obszernych badań powinny znaleźć zastosowanie w dalszych badaniach prowadzonych przez zespół prof. Celewicza. Będzie to niewątpliwą zasługą p. mgr. Dagmary Baraniak. Pracę należy w częściach opublikować, gdyż uzyskane rezultaty są tego warte.

Przy przygotowaniu publikacji należy zwrócić uwagę na popełnione w opisie błędy i usterki które zauważyłem czytając pracę :

Str.31,wiersz 4 od góry                      brak odnośnika literaturowego do pracy Petera Grießa

Str.53,wiersz 5-7 od góry                      istotną rzeczą podstawnika metylowego na N-7 w guanozynie czapeczki jest jego czwartorzędowość dająca dodatni ładunek wyróżniający ten koniec mRNA od ujemnego charakteru pozostałej cząsteczki

Str.67, schemat 25                              związki podpisane **130, 131, 132** powinny mieć oznaczenia **83, 84, 85.**

Str.67, wiersz 6 od dołu                      związek **86** trzeba nazwać jako acetylowany rybozyd 2-amino-6-azydopuryny

Str.75, rysunek 8                              para elektronowa na P w fosforynie nadaje układowi niepłaski kształt, nazwa układ trygonalny sugeruje płaskość układu.

Str.79 wzór związku 127 powinien zawierać grupę OH połączoną z atomem fosforu

Str.109, wiersz 12 od góry                      „podwójnej reakcji eliminacji” powinno być - następnej reakcji eliminacji

Str.115, wiersz 8 od dołu                      „na przykład  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ , powinno być

$[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$  i ta sama pomyłka w tabeli 1 na tej samej stronie.

Str.117, wiersz 13 od góry                      powinno być                      na schemacie 50

Str.130, wiersz 3 od góry dotyczy enzymu przenoszącego L-fukozę a nie jak jest w tekście L-fruktozę; to zupełnie inny cukier.

Str.139, opis schematu 59 zamiast (e),(f),(g) powinno być (f),(g),(h)

Str.139, wiersz 15 od dołu powinno być na schemacie 59

Str.151, wiersz 8 od dołu powinno być (Schemat 61c ii)

Str.156, schemat 68 rysunek zawiera wiązania zaznaczone wężykiem umownie oznaczającym dowolną konfigurację a pod związkami zaznaczone jest (9R) – jest to sprzeczność.

Str.176, wiersz 8 od góry trzeba zamienić opis rysunek 54 na 53 i na dole strony 53 zamienić na 54

Str.185, wiersz 3 od góry powinno być (rysunek 57)

Str.264 i 272 pod nr. [11] i [181] zamieszczono bardzo ważną ale tą samą pracę K.B.Sharpless'a.

Nie wypisałem pomyłek literowych.

Uwagi dyskusyjne:

Str.111 zwykle dla spontanicznych reakcji mówi się o ujemnej  $\Delta G$

Str.119 w związku 192 autorka porównuje wielkość fragmentu  $-\text{CH}_2-(\text{CCHN}_3)-\text{CH}_2-$  z wiązaniem fosfodiastrowym  $-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ . Jaka jest rzeczywista różnica w wymiarach, jeżeli uwzględnić kształt i kierunek wiązań triazolu.

Str.120 w związkach opisanych schematem 52 autorka widzi podobieństwo do puryny – proszę to wyjaśnić.

Str.121 autorka pisze o przeniesieniu elektronu z puryny na kumarynę przez łańcuch alifatyczny złożony z sześciu atomów węgla. Myślę, że ten łańcuch umożliwia zbliżenie się pierścieniowych układów i ułożenie się jednego nad drugim, nie daje jednak możliwości zaznaczonego na rysunku przepływu elektronów. Proszę zaprzeczyć lub potwierdzić.

Str.135. grupa benzoilowa usuwana jest metanolemowym roztworem amoniaku. Czy to był suchy roztwór, jak był uzyskany?

Z prawdziwą przyjemnością przeczytałem pracę mgr. D.Baraniak. Profesjonalnie wykonane syntezy, wiarygodne spektralne dowody poprawności opisywanych struktur, pełne wykorzystanie otrzymanych kluczowych substancji wyjściowych świadczą o dojrzałości doktorantki jako badacza chemika i Jej pracowitości.

Mogę oficjalnie stwierdzić, że praca doktorska mgr. Dagmary Baraniak spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim. Z pełnym przekonaniem stawiam wniosek Radzie Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr.Dagmary Baraniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.



Marcin Dąbrowski

Bydgoszcz, marzec 2012 r.