



UNIVERSITAS
OPOLIENSIS

Katedra Farmacji i Chemii Ekologicznej
WYDZIAŁ CHEMII, UNIWESYTET OPOLSKI
ul. Oleska 48, 45-052 Opole, Poland
tel. +48 077-4527115

Opole, 6 listopada 2023r.

prof. dr hab. Jacek Lipok

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Małej



p.t.: ***Self-promoted Glycosylations with Tichloroacetimidate Glycosyl Donors:
Synthesis of N-glycosides***

przygotowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
pod kierunkiem
prof. zw. dr hab. Henryka Koroniaka
oraz
Assoc. Prof. Christiana Marcusa Pedersena

Glikozydy, a wśród nich N-glikozydy należą do najbardziej rozpowszechnionych naturalnych połączeń chemicznych. Wynika to z sekwencji reakcji tworzących kluczowe ścieżki przemian metabolicznych, wszystkich znanych nam żywych organizmów. Chociaż tak rozpowszechnione, najczęściej wiązane są z roślinami, jako źródłem występowania, gdyż to właśnie rośliny, od tysięcy lat stosowane w tradycyjnej medycynie, prowadzą niezwykle efektywną biosyntezę tych bioaktywnych substancji. W każdym z podręczników farmakognozji wymienia się co najmniej kilka, zróżnicowanych strukturalnie klas glikozydów reprezentowanych przez pochodne: fenolowe, flawonoidowe, saponinowe, antrachinonowe, kumarynowe, cyjanowe, irydoidowe, aminowe. Wiele tego typu połączeń chemicznych stanowi strukturalne wzorce współcześnie stosowanych leków nowych generacji. Szczególnym zainteresowaniem wśród N-glikozydowych pochodnych cieszą się nukleozydy tworzące kwasy nukleinowe. Wpłynęły na to zarówno możliwości modyfikacji materiału genetycznego wspierane dynamicznym rozwojem technik CRISPR – Cas9 i Cas12, jak i opracowanie szczepionek mRNA.

Odnosząc się do aktualnych osiągnięć dotyczących otrzymywania glikokoniugatów można zauważyć, że mimo wielu opracowanych i stosowanych już metod, synteza N-

glikozydów wciąż stanowi wyzwanie biorąc pod uwagę wydajności reakcji oraz chemo- i stereoselektywność tych procesów. Zdecydowana większość aktualnie stosowanych procedur syntetycznych wymaga użycia katalizatorów, bądź promotorów określonych przemian, a w przypadku niektórych konieczne jest zastosowanie warunków reakcji dalece odbiegających od zasad zielonej chemii. Z tego powodu wciąż istnieje potrzeba dogłębnego poznawania procesów syntezy N-glikokoniugatów, którego efektem będzie opracowanie metod bliższych współczesnym wymaganiom stawianym syntezie chemicznej. Dlatego wszystkie wartościowe wysiłki badaczy, których przedmiotem jest zrozumienie mechanizmów powstawania pochodnych N-glikozydowych, dzięki czemu możliwa będzie chemo- i stereoselektywna kontrola tworzenia tych związków, są tak cennymi działaniami.

Aktywność naukowa Pani mgr Patrycji Małej, której formalnym efektem jest niniejsza dysertacja poświęcona omówieniu nowej strategii otrzymywania N-glikozydów posiadających ugrupowanie amidowe, sulfonamidowe oraz karbaminianowe, bardzo dobrze lokuje się w tej sferze działań.

Rozprawa doktorska, której ocena została mi powierzona przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM, została przygotowana w języku angielskim w formie klasycznej, obszernej monografii liczącej łącznie 249 stron, podzielonej na dwie odrębnie numerowane części. Część pierwsza (numery stron I – X) zawiera niezbędne informacje formalne, które identyfikują tę monografię jako rozprawę doktorską, gdyż wyodrębniono: stronę tytułową, streszczenia – kolejno w języku angielskim i polskim podziękowania, zwięzłą informację o Autorce i Jej dorobku ujętym w dysertacji, spis treści, a także wykaz stosowanych skrótów i akronimów. Część drugą (numery stron 1 – 239) tworzy zestaw zagadnień merytorycznych, które przedstawiono w trzech rozdziałach (Chapter I – III), z których pierwszy poświęcono zaprezentowaniu problematyki badań, a dwa kolejne zawierają bogato udokumentowane omówienia przebiegu i efektów intensywnych prac badawczych przeprowadzonych przez Autorkę. Warto zauważyć, że obydwa rozdziały; Chapter II oraz Chapter III, stanowią autonomiczne merytorycznie opracowania, niemniej posiadają identyczną strukturę podrozdziałów, co sprzyja klarownemu przekazowi treści dedykowanych konkretnym zagadnieniom.

Uważam, że zastosowany układ dysertacji dobrze odzwierciedla przyjętą przez Doktorantkę koncepcję narracji, w której lektura aktualnego stanu wiedzy na temat syntezy pochodnych glikozydowych, ze szczególnym uwzględnieniem N-glikozydów, prowadzi do konkluzji zręcznie sformułowanej jako wyodrębniony (Goals of Research) i dobrze sformułowany cel prowadzonych przez Nią prac badawczych.

Najważniejszymi elementami wspomnianego celu uczyniono opracowanie wydajnego i stereoselektywnego sposobu otrzymywania selektywnie funkcjonalizowanych N-

glikozydów, z wykorzystaniem „samo inicjującej” (self-promoted) glikozylacji i strategii ortogonalnych grup ochronnych. Warto zwrócić uwagę na sposób zaprezentowania znaczenia N-glikozydów o precyzyjnie zdefiniowanej strukturze, jako związków o atrakcyjnym zakresie wykorzystania we współczesnej farmacji i medycynie, zestawiony z aktualnymi i co warto zaznaczyć; bardzo nielicznymi pracami na ten temat. Zdaniem Recenzenta podkreśla to wartość niniejszej dysertacji.

Zagadnienia omówione w rozdziale „Chapter I”, stanowią zwarte kompendium, którego lektura pozwala na docenienie wyzwania z jakim mierzyła się Pani mgr Patrycja Mała. Wyrażając uznanie dla jakości opisu problematyki podjętych badań chciałbym prosić o wyjaśnienie roli i znaczenia substancji nazwanych przez Doktorantkę „scavengers”, które w myśl podanych informacji mogą wpływać na proces glikozylacji. Czy znane są przykłady i ewentualny mechanizm działania owych „zmiataaczy” („scavengers” ang.) wspomnianych przez Autorkę wśród aktywatorów donorów glikozylowych i czynników inicjujących procesy glikozylacji ?

Treści zawarte w dwóch kolejnych rozdziałach; Chapter II i Chapter III, w pełni odpowiadają dążeniu do osiągnięcia anonsowanego celu, z uwzględnieniem całego zestawu zadań badawczych zrealizowanych przez Autorkę. Dobrym pomysłem okazał się podział zagadnień merytorycznych na dwa wątki; pierwszy omówiony w rozdziale „Chapter II” poświęcono syntezie N-glikozylosulfonamidów i karbaminianów, natomiast drugi zaprezentowany w rozdziale „Chapter III” dotyczy otrzymywania N-glikozylowanych amidów. Zabieg ten pozwolił na uwypuklenie istotnych różnic i proceduralnych ograniczeń związanych z syntezą tych połączeń. Wartymi uwagi elementami kompozycji pracy są podsumowania podrozdziałów 2.2 oraz 3.2, w których Doktorantka wyeksponowała najbardziej istotne wątki dotyczące uzyskanych wyników i zakończyła je tabelarycznymi zestawieniami dostrzeżonych zalet i wad prowadzonych reakcji. Lektura wspomnianych zestawień tabelarycznych sprawiła, że chciałbym poznać opinię Pani Patrycji dotyczącą tego, który z rodzajów informacji: „zalety”, czy „wady” uznaje za bardziej wartościowe z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej?

Zaś z punktu widzenia formalizmu edycyjnego monografii, wypada zapytać o powód zróżnicowania numeracji rozdziałów – numeracja rzymska i podrozdziałów, którym przydano numery wyrażone cyframi arabskimi. Czy mariaż obu tych systemów skutkujący adekwatnymi zapisami np. II.2 był przez Autorkę rozważany?

Liczba zrealizowanych przez Panią Patrycję zadań badawczych i jakość uzyskanych wyników, budzą uznanie dla Jej zaangażowania i umiejętności wykorzystania posiadanej wiedzy i dostępnych informacji. Z kolei sekwencja realizacji tych zadań, wskazuje na zdolności Autorki do planowania i równoległego prowadzenia różnorodnych działań,

współgrających z wymaganiami poszczególnych etapów projektu. Wracając do idei projektu: zaprojektowania nowej ścieżki syntezy N-glikozydów posiadających ugrupowanie sulfonamidowe, karbaminianowe oraz amidowe, z wykorzystaniem specyficznych właściwości akceptora, który pełni jednocześnie funkcję nukleofila oraz aktywatora donora glikozylowego, warto zauważyć, że komplementarne wykorzystanie strategii ortogonalnych grup ochronnych, pozwoliło na uzyskanie, w sposób selektywny, pożądaných produktów prowadzonych syntez. Realizacja tak złożonego przedsięwzięcia wymagała sekwencji działań, wśród których można wyróżnić: dobór metod glikozylacji i syntezę najbardziej odpowiednich substratów, sprawdzenie czy N-sulfonylo karbaminiany i N-sulfonylo amidy mogą aktywować nietrwałe, kwasowo-labilne trichloroacetoimidany glikozyłu bez dodatku katalizatorów. Kolejnymi dobrze zdefiniowanymi i w pełni zrealizowanymi zagadnieniami były: ustalenie optymalnej procedury glikozylacji oraz zbadanie zakresu stosowalności tego procesu poprzez testowanie różnych donorów TCA glikozyłu i akceptorów ubogich w elektrony, a następnie opracowanie sposobów chemoselektywnego usuwania ugrupowań sulfonylowych i karbaminianowych. Szczególną atencją Recenzenta cieszą się przemyślane, bardzo precyzyjne i bogato udokumentowane pomiary wiodące do określenia struktury i konformacji otrzymanych produktów, z wykorzystaniem stosownie dobranych metod spektroskopowych.

Odnosząc się do wyników badań strukturalnych przeprowadzonych za pomocą różnych technik korelacyjnych magnetycznego rezonansu jądrowego, chciałbym wyrazić uznanie dla koncepcji i wyników całej serii pomiarów, połączonych z pośrednim zastosowaniem zależności i równania Karplusa do ustalenia oczekiwanych wartości stałych sprzężeń wicynalnych protonów, z których jeden jest podstawnikiem anomerycznego atomu węgla. Istotnym wynikiem tej części dociekań jest interesujące stwierdzenie dotyczące preferencji przestrzennego ułożenia podstawników, jak i formy konformacyjnej pierścienia cukru. I tak w przypadku np. pochodnych glikopiranozylowych, numerowanych jako związki 2.19 – 2.23 stwierdzono, że pierścień cukru w pochodnych 1,2-*trans*-glikozydowych częściej przyjmuje formę „krzeselka”, podczas gdy anomery 1,2-*cis*-glikozydowe przyjmują kształt „skręconej łódeczki”. Kolejnym interesującym rezultatem uzyskanym dzięki zastosowaniu pomiarów ¹H-NMR było stwierdzenie, że możliwa jest anomeryzacja donora TCA β-glikozydowego *in situ* zachodząca w rozpuszczalniku organicznym. Tego typu zjawiska rejestrowano do tej pory tylko w procesach glikozylacji zachodzących w cieczach jonowych.

Tak precyzyjna interpretacja była możliwa dzięki imponującemu zbiorowi cennych danych spektralnych włączonych do niniejszej dysertacji. Dlatego też chciałbym podkreślić znaczenie tak kompletnej informacji towarzyszących opisowi produktów powstających w omawianych reakcjach, jak i widm zgromadzonych w załącznikach (Appendix ..), gdzie

widma substratów, rozpuszczalników oraz produktów skojarzono ze wzorami strukturalnymi tych substancji. Nawiązując do wspomnianej precyzji prezentowanych danych, chciałbym zapytać o przypisanie sygnałów protonów widocznych na wielu widmach dołączonych do rozdziału „Chapter II”, o „okienka” w których obok wartości przesunięcia chemicznego znalazły się także litery alfabetu. Rzecz jest o tyle intrygująca, że nie znalazłem, co możliwe wobec mnogości danych w tekście rozprawy, odniesień do tychże przypisanych liter, byłbym więc wdzięczny za wyjaśnienie tej kwestii?

Zgodnie ze współczesnymi wymaganiami dotyczącymi jednoznacznego ustalenia struktury produktów przemian chemicznych, masy uzyskanych substancji zostały określone z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) z desorpcyjną jonizacją matrycy za pomocą lasera (MALDI). Ponieważ w zestawie zastosowanych metod spektroskopowych znalazła się również spektroskopia w podczerwieni (IR), wyniki prezentowane przez Panią mgr Patrycję Małą, uważam za w pełni wiarygodne.

Tym bardziej należy podkreślić osiągnięcia Autorki, która z sukcesem zmierzyła się z godnym wyzwaniem. Nie umniejszając znaczenia pozostałych, chciałbym wspomnieć o tych, które wiążą się bezpośrednio z celami podjętych przez nią badań.

Ponad wszelką wątpliwość udało się zatem Pani mgr Patrycjce Małej opracować nową strategię syntetyczną prowadzącą do otrzymania N-glikozydów posiadających ugrupowanie amidowe, sulfonamidowe oraz karbaminianowe. Co istotne, strategia owa oparta jest na reakcjach „samo inicjujących” - typu self-promoted, w toku których dochodzi do utworzenia wiązania N-glikozydowego w rezultacie zmieszania w rozpuszczalniku dwóch (przygotowanych wcześniej) substratów. Odnosząc się do specyfiki tych procesów należy zauważyć, że glikozylacje z zastosowaniem donorów α -glikozylowych przebiegały z wysoką selektywnością, prowadząc głównie do 1,2-trans-glikozydów, co istotnie zwiększa atrakcyjność opracowanej metody.

Uznając wartość merytoryczną rozprawy za nadrzędną, tylko z obowiązku recenzenta stwierdzam, że w rozprawie występują bardzo nieliczne i mało istotne niedoskonałości redakcyjne w rodzaju:

Str 6 schemat 1.3 - liczba „3” oznaczająca licznosc atomów chloru w TCA powinna być w indeksie dolnym

Str. 9 rys. 1.1 – struktura jednego z donorów „Imidate-like donors” została opisana jako „Glycosyl pseudoureas”, podczas gdy w stosownym opisie na str. 10 pojawia się forma „pseudo-urea”,

które w jakikolwiek sposób nie zmieniają bardzo pozytywnej oceny niniejszej pracy doktorskiej. Pragnę też zaznaczyć, że bardzo nieliczne komentarze i prośby o wyjaśnienie

niektórych kwestii, jedynie potwierdzają moją wysoką ocenę tej dysertacji i mam nadzieję, że staną się przyczynkiem dyskusji w trakcie finalnego etapu postępowania awansowego.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Małej chciałbym stwierdzić, iż uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i wartościowe, czego jednym z dowodów jest ich upublicznienie w czterech pracach zamieszczonych w czasopiśmie indeksowanych w światowych bazach abstraktowo-bibliometrycznych (WoS, Scopus). Prace te, do dnia przygotowania recenzji, cytowane były (bez autocytowań) 38 razy.

Chciałbym również podkreślić wysoką jakość identyfikacji substancji zsyntezowanych przez Doktorantkę i znakomite udokumentowanie tego procesu w oparciu o analizę strukturalną z wykorzystaniem różnych technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) oraz spektroskopii w podczerwieni (IR).

Na szczególnie uznanie zasługuje również bardzo precyzyjny i klarowny dla czytelnika sposób omawiania prezentowanych zagadnień, wskazujący na bardzo dobrą znajomość języka angielskiego, w którym napisano rozprawę doktorską. Nietuzinkowa jakość wspomnianych wyżej elementów warsztatu Doktorantki jako młodej badaczki zasługuje na pochwałę i jest bardzo dobrym prognostykiem jej dalszej kariery zawodowej.

Uznając oryginalność tematyki oraz wartość uzyskanych wyników jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane dysertacjom doktorskim stwierdzam, że w moim przekonaniu niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 pkt.1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), jak również warunki ujęte w art. 187, ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023r. poz. 742 ze zm.).

Biorąc pod uwagę moją jednoznacznie bardzo pozytywną ocenę dorobku naukowego Doktorantki, w tym niniejszej dysertacji, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Małej, do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ponadto, liczne walory tego opracowania, w tym szczególnie często podkreślana jakość efektów działań Doktorantki skłaniają mnie do zwrócenia się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, z propozycją wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Małej, w sposób i na zasadach przyjętych przez Wysoką Radę.





UNIVERSITAS
OPOLIENSIS

Katedra Farmacji i Chemii Ekologicznej
WYDZIAŁ CHEMII, UNIWESYTET OPOLSKI
ul. Oleska 48, 45-052 Opole, Poland
tel. +48 077-4527115

Opole, 6 listopada 2023r.

prof. dr hab. Jacek Lipok

UZASADNIENIE PROPOZYCJI WYRÓŻNIENIA
pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Małej

p.t.: ***Self-promoted Glycosylations with Tichloroacetimidate Glycosyl Donors:
Synthesis of N-glycosides***

przygotowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
pod kierunkiem
prof. zw. dr hab. Henryka Koroniaka
oraz
Assoc. Prof. Christiana Marcusa Pedersena

Aktywność naukowa Pani mgr Patrycji Małej, której formalnym efektem jest niniejsza dysertacja poświęcona omówieniu nowej strategii otrzymywania N-glikozydów posiadających ugrupowanie amidowe, sulfonamidowe oraz karbaminianowe, bardzo dobrze lokuje się w nurcie prac dedykowanych dogłębnemu poznawaniu procesów syntezy N-glikokoniugatów, którego efektem jest opracowanie metod bliższych współczesnym wymaganiom stawianym syntezie chemicznej. Stanowi wartościowy przykład pracy naukowej, której przedmiotem jest zrozumienie mechanizmów powstawania pochodnych N-glikozydowych, dzięki czemu możliwa będzie chemo- i stereoselektywna kontrola tworzenia tych związków.

Liczba zrealizowanych przez Panią Patrycję zadań badawczych i jakość uzyskanych wyników, budzą szacunek dla Jej zaangażowania i umiejętności wykorzystania posiadanej wiedzy oraz dostępnych informacji. Szczególne uznanie Recenzenta wzbudziły: precyzyjna interpretacja danych spektralnych będących wynikami pomiarów spektroskopowych, które jako imponujący jakością i obszernością zbiór, włączono do niniejszej dysertacji, a także mnogość i przede wszystkim jakość przeprowadzonych przez Doktorantkę syntez chemicznych. Efektem tych działań jest opracowana i zweryfikowana nowa strategia syntezy prowadząca do otrzymania N-glikozydów posiadających ugrupowanie amidowe,

sulfonamidowe oraz karbaminianowe. Co istotne, strategia owa oparta jest na reakcjach „samo inicjujących” - typu self-promoted, w toku których dochodzi do utworzenia wiązania N-glikozydowego w rezultacie zmieszania w rozpuszczalniku dwóch, przygotowanych/zsyntezowanych wcześniej, substratów. Uzyskanie takich rezultatów, szczególnie zaś ich weryfikacja, wymagało imponujących nakładów dobrze przemyślanych działań, począwszy od doboru odpowiednio szerokiego spektrum substratów, opracowania metod ich otrzymywania, optymalizacji prowadzonych reakcji pod kątem wydajności, po wyodrębnianie uzyskiwanych produktów oraz ich oczyszczanie i identyfikację.

Chciałbym także stwierdzić, iż uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i wartościowe, czego jednym z dowodów jest ich upublicznienie w czterech pracach zamieszczonych w czasopiśmie indeksowanych w światowych bazach abstraktowo-bibliometrycznych (WoS, Scopus). Prace te, do dnia przygotowania recenzji, cytowane były (bez autocytowań) 38 razy.

Nawiązując do innych osiągnięć, udokumentowanych w ocenianej dysertacji, chciałbym podkreślić również jakość identyfikacji substancji zsyntezowanych przez Doktorantkę, opartej na wnikliwej i umiejętnej analizie strukturalnej, z wykorzystaniem różnych technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) oraz spektroskopii w podczerwieni (IR).

Na szczególnie podkreślenie zasługuje również bardzo precyzyjny i klarowny dla czytelnika sposób omawiania prezentowanych zagadnień, wskazujący na bardzo dobrą znajomość języka angielskiego, w którym napisano rozprawę doktorską. W uzasadnienie nie sposób pominąć niezwykle starannej szaty graficznej, a także skrupulatnej edycji tekstu zawierającego wiele danych wymagających różnorodnej redakcji, w tym tabel i grafik.

Nietuzinkowa jakość wspomnianych wyżej elementów warsztatu Doktorantki jako młodej badaczki zasługuje na wyróżnienie i w przekonaniu Recenzenta jest bardzo dobrym prognostykiem Jej dalszej kariery zawodowej, w której mam nadzieję zdoła w pełni wykorzystać i rozwinąć wykazane umiejętności.

Biorąc pod uwagę powyższe uzasadnienie wspierające moją jednoznacznie bardzo pozytywną ocenę dysertacji oraz dorobku naukowego Doktorantki, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Małej, w sposób i na zasadach przyjętych przez Wysoką Radę.

