



Prof. dr hab. inż. Artur Mucha
Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
Tel.: (71) 320 34 46, 33 54, Fax: (71) 320 24 27
E-mail: artur.mucha@pwr.edu.pl

Wrocław, 19. 10. 2017

Recenzja pracy doktorskiej Pani Joanny Tomaszewskiej

Synteza i zastosowanie nowych fluorowanych oraz niefluorowanych monosacharydów

– bloków budulcowych do syntezy podjednostek kwasu hialuronowego

wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Henryka Koroniaka

w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wprowadzenie

Modyfikacje cząsteczek organicznych atomami fluoru lub grupami fluoroorganicznymi skutkują otrzymaniem nowych indywiduów chemicznych o unikalnych właściwościach fizykochemicznych i aktywności biologicznej. Charakterystykę organicznych związków fluoru determinuje, między innymi, elektroujemność atomu fluoru wpływająca na właściwości kwasowo-zasadowe, bierność chemiczna związana z wysoką trwałością / energią wiązania C-F, a także zwiększenie hydrofobowości bez dużej zmiany powierzchni molekularnej cząsteczki w porównaniu do analogów niefluorowanych. Związki fluoroorganiczne praktycznie nie występują w przyrodzie i charakteryzują się znaczną odpornością metaboliczną, co spowodowane jest brakiem mechanizmów ewolucyjnych dedykowanych zarówno ich syntezie, jak i transformacjom, a wyjątek stanowi *fluorynaza* (syntaza fluorku adenozyli). Fakty te mają ogromny wpływ na stymulowanie zainteresowania i poszukiwanie nowych zastosowań dla związków zawierających atom / atomy fluoru, które rozwinęły się w ostatnich latach z osobliwych perfluorowanych cząsteczek o niekonwencjonalnych właściwościach, do bogatych kolekcji nowych materiałów polimerowych, katalizatorów, a w szczególności agrochemikaliów i substancji farmaceutycznych. Dla tych ostatnich obliczono, że w 2010 roku około 20% podawanych leków zawierało atomy fluoru lub grupy fluoroalkilowe, jednak w ostatnich latach notowany jest trend wzrostu do około 30% przypadków wszystkich nowo zatwierdzonych leków. Jednocześnie, wpływ wprowadzenia atomu fluoru do cząsteczki organicznej jest subtelny i trudny do przewidzenia, stąd ciągła potrzeba otrzymywania i charakteryzowania nowych związków. Podstawowe cele badawcze pracy doktorskiej Pani Joanny Tomaszewskiej wpisują się w ten aktualny i atrakcyjny naukowo nurt badawczy i dotyczą głównie

modyfikowania grupami fluorowymi jednostek cukrowych wchodzących w skład struktury kwasu hialuronowego z użyciem reakcji chemii „click”. Jako dodatkowe cele przewidziano inne typy modyfikacji strukturalnych monosacharydów, na przykład wprowadzenie atomu fosforu do tych cząsteczek.

Ocena pracy

Przeprowadzone studia literaturowe i wyniki eksperymentalne uzyskane przez Panią Joannę Tomaszewską zostały ujęte w formie klasycznej rozprawy doktorskiej, liczącej 185 stron wydruku. Zawartość podzielono na kilka typowych części, a trzy główne rozdziały stanowią studia literaturowe (prawie czterdzieści stron), dyskusja wyników badań własnych (pięćdziesiąt stron) oraz część eksperymentalna (około sześćdziesiąt stron). Dodatkowo, w wydzielonych krótszych rozdziałach, Autorka zamieściła wprowadzenie do rozprawy, określiła cele pracy i podsumowała wyniki. Pracę ilustrowano ponad 150-cioma referencjami literaturowymi ujętymi w wykazie bibliograficznym. Układ pracy jest odpowiednio zrównoważony, przejścia między kolejnymi fragmentami są płynne i logiczne. Poruszanie się w tekście ułatwia wykaz używanych skrótów. Na dodatkowe pozytywne podkreślenie zasługuje umieszczenie na zakończenie atlasu wybranych widm ^1H , ^{13}C , ^{19}F oraz ^{31}P NMR, co pozwala zainteresowanemu czytelnikowi prześledzić jakość otrzymanych preparatów i wykonanego opisu. Recenzentowi zabrakło jedynie formalnego zestawienia osiągnięć naukowych doktorantki związanych z doktoratem: listy publikacji, wystąpień konferencyjnych i uczestnictwa w grantach.

Studia literaturowe rozprawy Pani Joanny Tomaszewskiej to rozdział wielowątkowy, który odnosi się do wszystkich elementów, metod i modyfikacji strukturalnych stanowiących przedmiot badań Doktorantki. Jako pierwsze przedstawione zostały: występowanie, charakterystyka, budowa, a przede wszystkim znaczenie medyczne kwasu hialuronowego, zarówno natywnego, jak i chemicznie modyfikowanego, w tym jako platformy dla systemów dostarczania leków. W dalszej kolejności zaprezentowano chemię „click”, w szczególności 1,3-dipolarną cykloaddycję azydków do alkinów. Pokazano warianty, mechanizmy i regioselektywność reakcji katalizowanych metalami. Omówiono mimetyzm triazoli i wiązań amidowych. W dwóch następnych krótkich podrozdziałach dokonano ogólnego wprowadzenia do chemii związków fosforoorganicznych i fluoroorganicznych.

Oceniając część literaturową dysertacji, stwierdzam, że z prawdziwą przyjemnością przeczytałem fragmenty dotyczące kwasu hialuronowego, jego funkcji i roli w organizmie i potencjału farmakologicznego, a także wprowadzenia do podstawowego narzędzia preparatywnego używanego przez Doktorantkę tj. 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Dyskusyjnie, włączyłbym do wstępu literaturowego również aspekty syntetyczne hialuronianu (synteza monomerów, glikozylacja, modyfikacje i koniugaty). Autorka opiera się na tej wiedzy w badaniach własnych wykorzystując lub adaptując niektóre z opisanych metod syntetycznych do swoich celów. Odpowiednie wprowadzenie na ten temat rozszerzałoby opis głównego przedmiotu badań. Informacje z tych dwóch zakresów (kwas hialuronowy oraz cykloaddycja Huisgena) wprowadzają precyzyjnie w eksplorowaną przez

Autorkę tematykę i podstawową metodologię syntetyczną, są aktualne i stanowią cenny materiał źródłowy. Zrezygnowałbym natomiast z krótkich, mniej spójnych i nie tak dogłębnych, a czasem wręcz encyklopedycznych, fragmentów dotyczących związków C-P i C-F.

Podstawową jednostką kwasu hialuronowego zaplanowaną do modyfikacji była *N*-acetylo-D-glukozamina. Postawione przez Doktorantkę cele wymagały otrzymania odpowiednio chronionych monosacharydów zawierających grupę azydkową lub alkinyłową w tej strukturze jako substratów cykloaddycji, a także komplementarnych komponentów fluorowanych. Bazując na odpowiednich *O*-acetylowanych pochodnych 2-deoksy-2-trifluoro- lub 2-trichloroacetamidowych wprowadzono pożądane fragmenty strukturalne podstawiające hemiacetalowy atom węgla i otrzymano odpowiednie propargilopiranozydy i azydki. Grupą azydkową modyfikowano także fragment acetamidowy. Odbyło się to w wyniku sprzęgania glukozaminy z kwasami bromo- lub azydokarboksyłowymi (i następczą substytucję NaN_3 w tym pierwszym przypadku). Komplementarne składniki cykloaddycji otrzymano z dostępnych handlowo polifluorowanych alkoholi (po transformacji w tosylany lub mesylany) lub jodków alkilowych. Przekształcano je w azydki organiczne ogrzewając konwencjonalnie w obecności NaN_3 lub indukując przebieg podstawienia mikrofalowo. Z fluorowanych alkoholi otrzymano także etery propargilowe.

Dla układów, w których powstający pierścień triazolowy był fragmentem reszty acylującej aminocukier, reakcje chemii „click” katalizowane układem CuSO_4 / askorbinian sodu przebiegały z dobrą lub bardzo dobrą wydajnością (często powyżej 90%) i w łagodnych warunkach. Mniej reaktywne były grupy podstawiające hemiacetalowy atomu węgla, a zadawalające przereagowanie osiągnięto w warunkach zasadowych z użyciem CuI . O ile w przypadku azydocukrów można mówić o przeszkodach sterycznych i wpływie grupy sąsiadującej, o tyle w przypadku propargilopiranozydów zaobserwowane trudności wymagałyby dodatkowego komentarza. Uznając układ triazolu za izosteryczny względem wiązania amidowego, w analogicznych pozycjach do położenia heterocyklu zaplanowano również wprowadzenie reszt fosforowych jako mimetyków tetraedrycznych wspomnianego wiązania. W tym celu halogenopochodne lub azydki badanego monosacharydu przekształcono odpowiednio w fosfoniany w reakcji Arbuzowa lub fosforamidy w reakcji Staudingera.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych Pani Joanny Tomaszewskiej uzyskanych w ramach pracy doktorskiej zaliczyłbym:

- wieloetapową syntezę modyfikowanych jednostek *N*-acetylo-D-glukozaminy hialuronianu, zawierających grupę azydkową lub alkinyłową, jako substratów reakcji chemii „click”, a także odpowiednich komponentów fluorowanych,
- uzyskaną stereoselektywność syntezy substratów, co przełożyło się na zdefiniowaną stereochemię produktów,
- przetestowanie i opracowanie warunków oraz przeprowadzenie 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena dla serii otrzymanych substratów, co skutkowało otrzymaniem kolekcji kilkudziesięciu złożonych strukturalnie sacharydowych pochodnych 1,4-dipodstawionych 1,2,3-triazoli, zawierających reszty polifluoroalkilowe, a także fosfonianów i fosforamidów,

- wstępne wyniki transformacji wybranych produktów w akceptorowe bloki budulcowe do utworzenia wiązania (1→3)-glikozydowego.

Lektura rozdziału poświęconego dyskusji wyników zdradza ogrom pracy eksperymentalnej włożonej przez Autorkę w przeprowadzenie opisanych przemian. Badane monosacharydy, z natury polifunkcyjne, wymagały opracowania określonej wieloetapowej strategii protekcji-deprotekcji, rozstrzygnięcia kwestii stereochemicznych oraz rozwiązania problemów z ich oczyszczaniem. Te dwa pierwsze aspekty ułożyły się po myśli Doktorantki. Większość transformacji zachodziła z dobrą wydajnością lub została zoptymalizowana do takiego poziomu. Nie zaobserwowano krytycznych reakcji ubocznych, które uniemożliwiłyby realizację celów syntetycznych. Jak często natomiast napotykanego w preparatyce organicznej, najbardziej uciążliwe okazały się separacja i oczyszczanie związków. Praktycznie po każdej operacji Doktorantka była zmuszona do chromatograficznego rozdziału mieszaniny poreakcyjnej. Wymagało to indywidualnego podejścia i nie w każdym przypadku przyniosło całkowicie satysfakcjonujące wyniki, a szczególnie kłopotliwe było w przypadkach użycia dużego nadmiaru substratów / reagentów.

Wyniki badań Pani Joanny Tomaszewskiej w dużej części zostały już opublikowane. Zgodnie z danymi bazy Scopus (z dnia 16.10.2017) Doktorantka jest współautorką trzech publikacji w czasopismach z listy JCR, które ukazały się w latach 2016 i 2017. Artykuły prezentują wyniki odnoszące się do określonych fragmentów rozprawy: publikacja w *Journal of Fluorine Chemistry* do syntezy fluorowanych monosacharydów, pochodnych gluko- i galaktozaminy, publikacja w *Arkivoc* do preparatyki fluorowanych azydków jako substratów, publikacja w *Phosphorus, Sulfur and Silicon* do otrzymywania fosfonianów i fosforamidów.

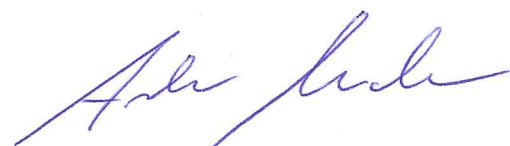
Dysertację napisano zrozumiałym, poprawnym i profesjonalnym językiem naukowym, a tok narracji prowadzony jest w sposób klarowny i logiczny. Miejscami można oczywiście dostrzec pewne rozluźnienia tej dyscypliny, co skutkuje drobnymi nieściśłościami gramatycznymi czy żargonowymi. Ta niewielka swoboda literacka zaowocowała np. jednym z barwniejszych określeń nukleofila, które udało się napotkać Recenzentowi – „*indywiduum molekularne, które lubi deficyt elektronowy*”. Należy pokreślić, że są to nieliczne wyjątki, a strona formalno-merytoryczna zasługuje na wysoką ocenę. W szczególności, ilustracja graficzna jest bogata i starannie przygotowana, styl schematów i rysunków jest jednolity stylistycznie, a legendy uwzględniają szczegóły eksperymentalne. Należy również docenić tabelaryczne zestawienia struktur substratów i produktów, co pozwala dobrze śledzić zróżnicowanie strukturalne kolekcji związków otrzymywanych w danej reakcji wraz z wydajnością transformacji. Równie staranne jest przygotowanie przez Doktorantkę części eksperymentalnej. Poprawność nowych struktur została potwierdzona pełną charakterystyką spektroskopową (^1H , ^{13}C , ewentualnie ^{19}F oraz ^{31}P NMR) oraz wynikami spektrometrii mas. Podana jest postać próbki oraz wydajność, a dla serii opublikowanych związków opis uzupełniono o wartości skręcalności właściwej oraz temperatury topnienia ciał stałych. W zapisie ułamków dziesiętnych Autorka niestandardowo używa systemu międzynarodowego (kropki), a nie przecinka tradycyjnie przyjętego w języku polskim.

W ramach dyskusji merytorycznej prosiłbym Autorkę o odpowiedź / ustosunkowanie się do poniższych kwestii, które nasunęła mi lektura dysertacji.

1. W jaki sposób temperatura wrzenia rozpuszczalników stosowanych w układach do elucji w oczyszczaniu chromatograficznym może spowodować „spadek wydajności” eterów propargilowych (strona 63, Tabela 6).
2. Czy poprawne jest użycie sformułowania „grupa azydowa”, w odniesieniu do azydków.
3. Czy wykonano wstępne próby glikozylacji z użyciem otrzymanych bloków budulcowych dla otrzymania disacharydów i jakie były ich ewentualne wyniki?
4. Czy nazwy związków, pochodnych triazolu, są poprawnie utworzone? Np. związek 99 (strona 118) i kolejne nie posiadają lokanta wskazującego, w której pozycji podstawiona jest jednostka cukrowa?

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z pracą doktorską Pani Joanny Tomaszewskiej stwierdzam, że w pełni odpowiada ona wymogom zawartym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) i może być podstawą nadania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo, poziom naukowy i rozpiętość badań opisanych w rozprawie doktorskiej, opublikowanie dużej części wyników oraz formalne przygotowanie dysertacji, proszę Wysoką Radę o rozważenie możliwości jej wyróżnienia.



Artur Mucha