

prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12
tel. 58 347 11 34, e-mail: maria.milewska@pg.edu.pl

Gdańsk, 24.01.2018

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mateusza KUPRIANOWICZA

„Fluorowane izoksazolidynowe pochodne zasad kwasów nukleinowych”

Tematyka badań, które realizował mgr Mateusz Kuprianowicz, a których wyniki opisał w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, mieści się w głównym nurcie zainteresowań grupy badawczej Jego promotor, dr hab. Hanny Wójtowicz-Rajchel. Najogólniej, jest to chemia zasad purynowych i pirymidynowych jako podstawowych elementów budulcowych w syntezie modyfikowanych nukleozydów oraz nukleotydów, w tym szczególnie projektowanie struktur oraz synteza fluorowanych cyklicznych i acyklicznych analogów C- oraz N-nukleozydów.

Szczególne zainteresowanie pochodnymi alkenylouracylu zaczęło się w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku, gdy stwierdzono, że 5-(2-bromowinylo)uracyl oraz 5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydina wykazują aktywność przeciw wirusowi HSV-1. Z drugiej strony, ogólnie znane jest zainteresowanie fluorowanymi analogami zasad wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Szereg fluorowych analogów nukleozydów i nukleotydów jest znanych jako inhibitory szeregu enzymów, m. in. syntetazy tymidylanowej, polimerazy DNA czy odwrotnej transkryptazy.

Taka sytuacja powoduje, że wzrasta potrzeba opracowywania efektywnych metod syntezy, analogów zasad kwasów nukleinowych jako niezbędnych elementów budulcowych modyfikowanych nukleozydów i nukleotydów.

Znaczące osiągnięcia w chemii organicznej związków fluoru są udziałem naukowców z zespołu prof. Henryka Koroniaka z Wydziału Chemii UAM. Badania nad otrzymywaniem i właściwościami modyfikowanych podstawnikami fluorowymi nukleozydów i nukleotydów, które realizował p. Kuprianowicz w trakcie Studium Doktoranckiego pod opieką prof. Hanny Wójtowicz-Rajchel, stanowiły element realizacji tego programu. Wyniki tych badań zostały przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Przedmiotem rozprawy są przede wszystkim prace nad projektowaniem i syntezą:

- izoksazolidynowych analogów adenozyne z podstawnikami fluorowymi
- analogów fluoroizoksazolidynowych nukleozydów zawierających w pierścieniu izoksazolidynowym grupy: hydroksymetylenową, metanofosfonianową lub metoksykarbometylenową
- pochodnych izoksazolidynowych C⁵-podstawionych analogów uracylu

Otrzymane związki zostały poddane analizie spektralnej przy pomocy spektroskopii protonowego, węglowego i fluorowego NMR. Ponadto zostało przebadane zahamowanie inwersji na atomie azotu w pierścieniu izoksazolidynowym, a wyniki te zostały poparte obliczeniami kwantowo-mechanicznymi.

Pan mgr Mateusz Kuprianowicz przeprowadził syntezę kilkunastu nowych fluoroizoksazolidynowych analogów i pochodnych nukleozydów i zasad azotowych. W syntezie każdego w/w związku została wykorzystana reakcja 1,3-dipolarnej cykloadycji N-alkilonitronów do wiązania podwójnego zmodyfikowanej cząsteczki heterocyklicznej zasady.

Ten interdyscyplinarny charakter pracy zasługuje na szczególne podkreślenie. Doktorant nie tylko wybrał metodę syntezy, ale i otrzymał kilka serii związków, następnie zbadał ich właściwości spektroskopowe, a wyniki potwierdził obliczeniami.

Dysertacja pana Mateusza Kuprianowicza jest obszernym, bo liczącym 265 stron, opracowaniem; ilustrowana jest licznymi schematami (62) i rysunkami (50) oraz zawiera 13 tabel i cytaty z 244 pozycji literaturowych. Układ pracy jest zbliżony do standardowego. Można w nim znaleźć takie rozdziały jak: wprowadzenie, część literaturową, cel pracy, badania własne – opisujące uzyskane wyniki i ich dyskusję, podsumowanie, część eksperymentalną, spis cytowanej literatury. Integralną częścią dysertacji są: katalog zawierający pomierzone widma NMR (90 widm) oraz załączniki w postaci 13 tabel zawierających głównie porównania doświadczalnych i obliczonych wartości przesunięć chemicznych otrzymanych związków, które nie znalazły się w zasadniczej części dysertacji. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, zestawienie dorobku publikacyjnego Doktoranta oraz spis treści. Wykaz niektórych skrótów stosowanych przez Autora w tekście rozprawy jest umieszczony na jej początku.

Jednostronicowe **Wprowadzenie** zapoznaje czytelnika z tak ważkim problemem jakim jest budowa i rola w organizmach żywych kwasów nukleinowych.

Część literaturowa zajmuje 60 stron i składa się niejako z trzech części. Pierwsza z nich jest przeglądem związków chemicznych o strukturze analogicznej do nukleozydów, często wykorzystywanych w lecznictwie jako środki przeciwwirusowe czy przeciwnowotworowe. Autor zwrócił szczególną uwagę na modyfikacje strukturalne cząsteczek nukleozydów, zarówno w jednostce cukrowej, jak i w zasadzie. Opisał nie tylko modyfikacje struktury nukleozydów podstawnikami zawierającymi atomy fluoru, ale także innymi grupami funkcyjnymi. Szczególną uwagę zwrócił na te zmodyfikowane związki, które miały ciekawe właściwości biologiczne i znalazły zastosowanie w medycynie. Natomiast w drugim fragmencie części literaturowej Doktorant w sposób zwięzły lecz kompetentny, a zarazem interesujący, przedstawił z jednej strony syntezę, właściwości biologiczne oraz wykorzystanie izoksazolidyn do modyfikowania struktury nukleozydów; z drugiej – opisał reakcję [2+3] dipolarnej cykloaddycji. Trzecia część poświęcona jest podstawom tzw. chemii obliczeniowej.

Rozważania te są poparte 188 odnośnikami literaturowymi. Dobór tematów tej części rozprawy uważam za przemyślany, a całość czyta się przyjemnie. Tekst napisany jest dobrym, fachowym językiem, zilustrowany rysunkami i schematami, co ułatwia jego zrozumienie, również osobom nie zajmującym się tego typu problemami. Za wady tej części rozprawy należałoby uznać pewne zachwianie równowagi pomiędzy częścią pierwszą (39 stron) a drugą (16 stron), która bezpośrednio dotyczy problemów związanych z opisanymi w pracy badaniami.

Ponadto pozwolę sobie na podanie kilku uwag szczegółowych oraz niektórych z zauważonych przeze mnie niezręcznych sformułowań, wyrażen slangowych czy niezrozumiałych określeń:

- str 26 – „... jest poddawana deprotekcji grup hydroksylowych”
- str 36 – „... była ich możliwość do wewnątrz komórkowej fosforylacji..”
- str 38 – „... następuje proces odpłaszczania...”
- str 46 – „... różnorodność syntetyczna entekawiru ..”

schematy:

- str 34 Il.10 – niewłaściwie przypisane odczynniki
- str 39 Il.12, etap b – brak substratu 1,3-dioksolanu
- str 47 Il.17 – związek **103** nie jest pochodną benzoilową
- str 47 i dalej – co to jest Tr? może grupa trytylowa?
- Str 68 – rozumiem, że T- jest tyminą?

nazewnictwo:

- str 26 – związek **21** raczej podstawnik 5-[alkoksy-(p-nitrofenylo)]- ...
- str 37 – raczej należy używać określenia ‘centrum stereogeniczne’ (tak jak na str 121) a nie ‘asymetryczny atom’
- str 50 – nazwa „1-(2-deoksy-2-fluoro-4’-tio-β-D-arabinofuranozo)cytozyna”; jeżeli jest atom węgla 4’, to i atom 2’; reszta tianoanalogu cukru jest podstawnikiem, więc raczej należy używać nazwy podstawnika ... furanozylo..; ponieważ atom siarki jest członem pierścienia, to zamiast przedrostka ‘tio’ należy stosować określenie ‘tia’, tak jak np. na str 55 1,3-oksatianolan.

Nasuwa mi się jeszcze jedno pytanie: Co to jest *N*-tlenek formoliny? (s. 62) Może chodzi o morfolinę, ale Autorzy cyt. 140 przeprowadzili obliczenia symulacyjne dla diazometanu, tlenku azotu, nitronu (pochodnej metyloaminy), anionu allilowego, 1,3-butadienu, cyklopentadienu i etenu jako drugiego komponentu w reakcji [2+3]cykloaddycji.

Reasumując, **Część literaturowa** jest obszernym, kompetentnym opracowaniem, poświęconym omówieniu modyfikacji strukturalnych nukleozydów, które wykazują działanie biologiczne i bardzo często są wykorzystywane do zwalczania infekcji wirusowych lub w leczeniu nowotworów, a są luźno związane z tematyką dysertacji. Z drugiej strony, Autor opisał również te zagadnienia, których znajomość dotychczasowego stanu wiedzy jest niezbędna do właściwego zrozumienia i interpretacji wyników przeprowadzonych i opisanych w rozprawie badań. Opracowanie tych zagadnień przedstawione w Części Literaturowej zawiera wszystkie najistotniejsze informacje dostępne w literaturze, poparte cytatami z aktualnego piśmiennictwa. Język i styl opisu są generalnie dobre.

Cel pracy Autor opisuje w dwustronicowym rozdziale (str 83/84).

Wyniki przeprowadzonych badań wraz z dyskusją zostały przedstawione w trzech kolejnych podrozdziałach **Wyników i dyskusji**, poświęconych syntezie fluorowanych izoksazolidynowych pochodnych adenozyiny i analogów nukleozydów oraz nukleotydów; natomiast w trzecim podrozdziale omówiona została synteza izoksazolidynowych pochodnych różnie podstawionego uracylu zawierających w swojej strukturze skumulowane pierścienie. Wyniki prac syntetycznych, tak jak już wspominałam, zostały uzupełnione analizą spektroskopową z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego oraz obliczeniami molekularnymi.

W wyniku tak przeprowadzonej analizy mgr Mateusz Kuprianowicz wykazał, m. in. że:

- reakcja pomiędzy *N*-metylo- i *N*-*tert*-butylnitronami a poszczególnymi diastereoizomerami tetrafluoropropenyłowymi enamin adeniny przebiega regioselektywnie; zawsze powstają dwa diastereoizomery izoksazolidynowych analogów adenozyiny; są one rozróżnialne metodami spektroskopowymi
- stereozomery *Z*-tetrafluoropropenyłowych enamin adeniny są zaangażowane w wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania wodorowe i przyjmują maksymalnie planarną strukturę; podczas gdy drugi stereoisomer, takiej tendencji nie wykazuje. Znalazło to swoje potwierdzenie w obliczeniach molekularnych (DFT)
- izoksazolidynowych analogów adenozyiny nie można otrzymać w wyniku reakcji pomiędzy *N*-winylo pochodną adeniny i *N*-alkilo-*N*-trifluorometylnitronami
- dodatkowo funkcjonalizowane grupami karboksylowymi i hydroksymetylenowymi pochodne izoksazolidynowe homonukleozydów można otrzymać w reakcji [2+3]cykloaddycji zachodzącej pomiędzy krotonianowymi pochodnymi zasad kwasów nukleinowych oraz *N*-metylo-*N*-trifluorometylnitronem
- wiązanie podwójne węgiel C⁵-węgiel C⁶ w tetrafluoropropenyłowej enamini uracylu w warunkach 1,3-dipolarnej cykloaddycji wykazuje taką reaktywność, że skutkuje to powstawaniem izoksazolidynowych pochodnych uracylu, w których dwa heteropierścienie są skumulowane.

Wyniki przeprowadzonych badań wraz z dyskusją przedstawiono i opisano w sposób w pełni profesjonalny; ich interpretacja jest w znakomitej większości przypadków wysoce kompetentna i dojrzała, a dyskusja wyczerpująca, dokładna i wszechstronna. Doktorant w znakomitej większości przypadków unika wyciągania zbyt daleko idących wniosków i odnosi się do właściwie dobranych informacji literaturowych. Proszę jedynie o ustosunkowanie się do kilku szczegółowych problemów.

1. Str. 92, tab. IV.1 – Zaproponowane przez Autora oddziaływania typu wiązań wodorowych pomiędzy atomami wodoru i azotu oraz atomami wodoru grupy metinowej i fluoru są oddziaływaniami stosunkowo słabymi. Różnice w przesunięciach chemicznych badanych jąder dla izomeru *Z*-2 w widmach NMR pomierzonych w CDCl₃ i DMSO-*d*₆ są nieznaczne, a mianowicie 2 ppm dla jądra ¹⁹F i 0.55 ppm dla protonu, co mogłoby sugerować obecność

oddziaływań tego typu w obrębie cząsteczki. Czy istnieją inne dowody na ich obecność w stereoisomerze Z-2?

2. Według mnie, na podstawie widm temperaturowych ^{19}F NMR, omówionych na str. 95, nie można przyjąć, że temperatura 333 °K jest temperaturą koalescencji. Czy obliczano stałą szybkości procesu inwersji na atomie azotu, wykorzystując temperaturę koalescencji?
3. Str. 97 – Na jakiej podstawie zostały przyporządkowane wartości wycylnych stałych sprzężenia spinowo-spinowego $^3J_{\text{HF}}$ stereoisomerom, w których jądra fluoru i wodoru są w układzie *cis* lub *trans*?

Pragnę stwierdzić, że nie znalazłam w tej części pracy fragmentów, do których można by wysunąć istotne zastrzeżenia natury merytorycznej, a powyższe uwagi mają charakter dyskusyjny. Z obowiązku recenzenta muszę jednak odnotować następujące niekonsekwencje, które pojawiają się w recenzowanej dysertacji:

Str. 166/7 – izoksazolidyna/izoxazolidyna

Str. 40/41 – konfiguracja R/S pisana jest raz kursywą, raz prostą czcionką

Str. 34 – grupa tozylowa jest określona jako Tol, ale na str. 41, 46 jako Ts; podobnie kwas *p*-toluenosulfonowy na str. 65 jest *p*-TsOH, ale na str. 68 – *p*TSA

Str. 36 – Bz oznacza benzoil, ale na str. 41 czy 47 Bz oznacza grupę benzylową, która np. na str. 47, 72 jest oznaczona przez skrót Bn

Str. 92, 108 – pojawia się nazwa ‘hydroksyamina’, a powinno być ‘hydroksyloamina’ tak jak na str. np. 92, 96 czy 112.

Proponuję raczej używać terminu ‘widmo mas’ zamiast ‘widmo masowe’ (np. str. 158); nie mogę też się zgodzić na nazywanie stereoisomerów, powstających na skutek inwersji na atomie azotu jako ‘inwertomerów’ np. str 125, chociaż rozumiem skąd taka nazwa.

W części eksperymentalnej (rozdz. 6) zwięźle i poprawnie Doktorant prezentuje przeprowadzone syntezy. Wszystkie otrzymane związki zostały scharakteryzowane w oparciu o widma ^1H , ^{19}F i ^{13}C NMR, IR oraz wysokorozdzielczą MS i/lub analizę elementarną. Moja uwaga do tej części pracy jest związana z pożądanym, bardziej uważnym stosowaniem nawiasów w nazwach związków, np. str. 167 z oczywistych względów pochodna metanolu nie może mieć podstawnika na atomie węgla C5 –postawienie nawiasu w niewłaściwym miejscu skutkuje błędem merytorycznym. Należałoby stosować wszystkie rodzaje nawiasów, a nie tylko owalne. Nie mogę zgodzić się na nazywanie diastereoisomerów **4a** i **4b** oraz **6a** i **6b** (str 159/160) jako *cis* i *trans*, ponieważ taka nomenklatura zarezerwowana jest dla związków cyklicznych dipodstawionych. Natomiast w/w związki są tripodstawione, a na dodatek posiadają czwarty podstawnik zlokalizowany na atomie azotu.

W **Katalogu widm i Załącznikach** (90 widm oraz 9 tabel) zostały umieszczone dane spektralne oraz obliczeniowe, które omawiane były w zasadniczej części dysertacji. Szkoda, że na widmach NMR położenie poszczególnych linii w multipletach nie podano w Hz, co ułatwiłoby ewentualne obliczanie stałych sprzężeń spinowo-spinowych badanych jąder (szczególnie, że widma mierzono na czterech różnych spektrometrach).

Manuskrypt prezentuje bardzo dobry poziom graficzny i redakcyjny. Jednak przy tak obszernym opracowaniu trudno nie popełnić błędów typu literówek, których zaobserwowałam dosyć dużo. Kilka przykładów: s. 33 ‘enancomerami’, s.36 sch. II.11g ‘CH₂OH’ oraz ‘2-3butanediol’, s.40 ‘achirlanych’, s.43 ‘cyklopentenon’, ‘enencomer’, ‘naplanocynę’, s. 44 ‘cyclo’, s. 45 ‘organometalicznych’, s.49 ‘tioanlogi’, s. 65 ‘5-acetoksyizoksazlodynowego’ s. 107 ‘posiadana’ zamiast ‘posiadania’, s. 157 ‘...fosownianowy’, itd. Nie mam natomiast zastrzeżeń do sposobu cytowania literatury. Sugerowałabym, aby w przyszłości zamiast **Podsumowania**, które w znacznej mierze jest powtórzeniem treści zawartych w **Streszczeniu**, zamieścić rozdział zawierający wnioski wypływające z przeprowadzonych badań.

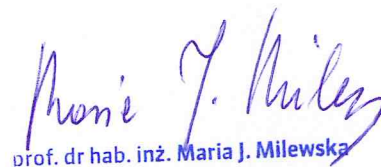
Reasumując, pracę pana mgr Marcina Kuprinowicza oceniam jako wartościowy wkład, zarówno w chemię izoksazolidyn, jak i w chemię nukleozydów funkcjonalizowanych podstawnikami zawierającymi atomy fluoru. Praca ta ze względu na pewną interdyscyplinarność przeprowadzonych

badania wymagała od Doktoranta opanowania wielu technik eksperymentalnych, teoretycznych i spektroskopowych. Autor podjął się trudnego zadania syntezy analogów i pochodnych nukleozydów, zawierających w swojej strukturze pierścień izoksazolidynowy. Chemia fluoru nie jest łatwą i bardzo często odbiega od ogólnie uznanych w naukach chemicznych reguł. Z drugiej strony – reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji z udziałem nitronów nie jest trywialną i łatwą do przeprowadzenia.

Wartość uzyskanych wyników znalazła swoje potwierdzenie w fakcie częściowego opublikowania w formie artykułów w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej: jedna praca w *Structural Chemistry* (IF 1.582, 1 cyt) oraz jedna w trakcie edycji (*New Journal of Chemistry* IF 3.269). Ponadto p. Kuprianowicz brał udział w licznych konferencjach o różnej randze, co zaowocowało 6 komunikatami oraz jednym 17-stronicowym opracowaniem.

Na podstawie przedstawionej mi pracy sądzę, że Doktorant jest już w pełni ukształtowanym, chociaż młodym badaczem.

Konkludując stwierdzam, że praca doktorska pana mgr Mateusza Kuprianowicza spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez art. 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dn. 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz §5.1 rozporządzenia MENiS z dn. 15 stycznia 2004r. (Dz. U. nr 15, poz. 128 z późniejszymi zmianami); tym samym wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

WYDZIAŁ CHEMICZNY
POLITECHNIKA GDAŃSKA