



INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Profesor Sławomir Jarosz

01-224 Warszawa
ul. Kasprzaka 44/52
Tel. (22) 343 23 20
Fax.: (22) 632 66 81
E-mail: slawomir.jarosz@icho.edu.pl

Warszawa 16.10.2017

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Tomaszewskiej pt.

”Synteza i zastosowanie nowych fluorowanych oraz niefluorowanych monosacharydów – bloków budulcowych do syntezy podjednostek kwasu hialuronowego”

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem profesora Henryka Koroniaka

oraz dr Katarzyny Koroniak-Szejn (promotor pomocniczy)

Badania były realizowane w ramach programu HOMING PLUS (FNP) oraz projektu NCN

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska (185 stron) mgr Joanny Tomaszewskiej składa się z kilku rozdziałów noszących tytuł: I. *Wprowadzenie*; II. *Część literaturowa*; III. *Cel pracy*; IV. *Dyskusja wyników*; V. *Podsumowanie*; VI. *Część eksperymentalna*; VII. *Bibliografia* oraz VIII. *Atlas wybranych widm*. W zasadzie praca charakter klasyczny; pewnym ‘novum’ jest jednak umieszczenie celu pracy w dalszej części (rozdział III), choć moim zdaniem ten rozdział powinien znaleźć się na początku.

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy była synteza nowych fluorowanych i niefluorowanych modyfikowanych monosacharydów, potencjalnych bloków budulcowych w syntezie podjednostek kwasu hialuronowego (HA). Kwas hialuronowy pełni bardzo ważne funkcje w organizmach żywych. Wiąże m.in. wodę nadając skórze elastyczność, dzięki czemu znalazł zastosowanie w medycynie estetycznej. Jego zastosowanie w innych dziedzinach medycyny np. ortopedii jest znaczące gdyż ułatwia smarowanie powierzchni stawowych. Poza tym kwas hialuronowy jest z powodzeniem stosowany jako nośnik leków.

Kwas hialuronowy jest polisacharydem posiadającym strukturę długich nierozgałęzionych łańcuchów o budowie liniowej, mogących zawierać od 200 do 20000 jednostek disacharydowych. Każda taka jednostka zbudowana jest z naprzemiennie ułożonych merów kwasu D-glukuronowego oraz N-acetylo-glukozaminy.

We wprowadzeniu Doktorantka zaznacza, że *‘Chemia cukrów jest interesującą dziedziną ze względu na różnorodność występowania monosacharydów. Są one częścią łańcucha DNA; D-glukoza jest podstawowym związkiem dostarczającym energię’*. Lista wymienionych tu właściwości jest mocno niekompletna. Polisacharydy są przecież odpowiedzialne za wymianę informacji między komórkami czy też determinują grupy krwi. Doktorantka zajęła się następnie przedstawieniem istotnych właściwości biologicznych kwasu hialuronowego oraz problemem jego modyfikacji, które to aspekty są przedmiotem badań wielu grup badawczych.

Doktorantka włączyła się w ten nurt i podjęła się syntezy modyfikowanych monosacharydów, które można by użyć w syntezie bloków budulcowych – disacharydów, – które z kolei mogłyby stanowić bloki budulcowe modyfikowanego HA. Te bloki monosacharydowe były modyfikowane ugrupowaniami zawierającymi funkcje fluorowe. Wynikało to z faktu, że związki zawierające fluor są często znakomitymi zamiennikami tych ‘normalnych’, a ponadto Doktorantka miała w pewnym sensie uproszczone zadanie wykonując pracę pod kierunkiem eksperta chemii fluoru: prof. Henryka Koroniaka.

Zadanie, które Doktorantka postawiła przed sobą, byłoby jeszcze bardziej ambitne, gdyby podano jak te modyfikowane monosacharydy przekształcić w di-sacharydowe bloki i jak je ‘wmontować’ do polimeru (HA). Mimo iż Doktorantka nie może, co zupełnie zrozumiałe, przeprowadzić syntezy modyfikowanego HA (jest to zadanie dla dużych grup badawczych), to powinna moim zdaniem wskazać potencjalne rozwiązania jak wykorzystać zsyntetyzowane przez siebie związki.

Część literaturowa podzielona jest na kilka podrozdziałów dotyczących kolejno: kwasu hialuronowego (rozdział 1 oraz 2), ‘chemii click’ (rozdział 3), fosfonianów i amidów kwasu fosforowego (rozdział 4) oraz chemii fluoru (rozdział 5). Wydawałoby się, że tematyka części literaturowej jest niezbyt spójna, ale jednak dość ściśle wiąże się ona z tezami doktoratu i pozwala na wnikliwe śledzenie osiągnięć doktorantki.

Mam kilka drobnych uwag do tej części. Omawiając reakcję Arbuzova doktorantka skupiła się na reakcji halogenków alkilowych/arylowych z fosforinami tri-alkilowymi. Jak wiadomo, warunki tej przemiany mogą być dość drastyczne (b. wysoka temperatura). A są przecież łagodniejsze wersje tej przemiany, o których warto by wspomnieć: reakcja halogenków organicznych z handlowo dostępnym fosforinem dialkylotrimetylosililowym. Co to są ‘naturalne fosfoniany’ (str. 35). Sformułowanie (str. 35): *‘dodatkowo związki te [fosfoniany] odgrywają ważną rolę w medycynie gdyż wykazują wysoką aktywność biologiczną’* jest bardzo lakoniczne i nieprecyzyjne.

W części ‘Cel Pracy’ (str. 43-44) doktorantka pisze m.in. *‘otrzymane modyfikowane monosacharydy stanowią interesującą bibliotekę ..’* Przecież jest to forma dokonana, a cel pracy powinien definiować założenia!

Głównym zadaniem Doktorantki była modyfikacja monosacharydów mogących wchodzić w skład podjednostki di-sacharydowej kwasu hialuronowego. Substratami w tych przemianach były łatwo dostępne 2-aminocukry: D-glukozamina i D-galaktozamina. Doktorantka zdecydowała się na modyfikacje w pozycji anomerycznej (a nie – jak pisze – na *‘anomerycznym atomie węgla’*) oraz w grupie aminowej w pozycji C2. Pierwszym etapem była synteza odpowiednich per-acetylowanych cukrów z wolną grupą aminową w pozycji C2 (**43** i **44** str. 46), które zostały otrzymane na drodze raczej standardowych przejść. Następnie Doktorantka poddała wolną grupę aminową reakcji acyloowania, otrzymując pochodne trichlorometylo- oraz trifluorometyloacylowe (odpowiednio: **45** i **46**). W pozycję anomeryczną została następnie wstawiona albo grupa propargilowa (**46** lub **48**) albo azydkowa (**55** i **56**). W kolejnej wersji syntezy Doktorantka otrzymała związki **62** i **63**, które zawierały funkcję azydkową w części aminowej glukozy oraz galaktozy. Kolejny podrozdział opisuje syntezę drugiego zestawu – tym razem ‘niecukrowych’ – substratów, czyli fluorowanych pochodnych alkoholi alifatycznych: zarówno azydków (Tabele 3-5, str. 59-62) jak i eterów propargilowych (Tab. 6, str. 63). Otrzymane tak substraty, poddała Doktorantka 1,3-dipolarnej

cykloaddycji Huisgena w wersji 'click' otrzymując szereg pochodnych z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami (str. 65-74).

W kolejnym podrozdziale zatytułowanym: *'Synteza fosfonianów oraz amidów kwasu fosforowego akceptorowej podjednostki HA'* Doktorantka przedstawia metodologię wprowadzenia funkcji fosforowej na grupę aminową w pozycji C2. Wychodząc z per-acetylowanej D-glukozaminy, w której grupa aminowa jest zabezpieczona resztą chlorometyloacylową, Doktorantka otrzymała w reakcji Arbuzova odpowiedni fosfonian (np. **61** → **127**). Reakcja per-acetylowanej glukozaminy zabezpieczonej grupą azydometyloacylową (**62**) z fosforynem trimetylowym doprowadziła do odpowiedniego amidu kwasu fosforowego **129** (wybrane przykłady z Tabeli 11, str. 78).

W rozdziale **4.2.** mgr Tomaszewska opisuje wprowadzenie do cząsteczki cukru, zawierającej już w swej strukturze atomy fluoru, funkcji fosforowej w pozycję C1. Wychodząc z D-glukozaminy, w kilku etapach otrzymała glikozyd **58**, w którym grupa aminowa w pozycji C2 jest zabezpieczona funkcją trifluorometyloacetylową, a w pozycji anomerycznej znajduje się ugrupowanie –CH₂CH₂OH (związek **58**; glikozyd β, str. 81). Ten substrat został przekształcony odpowiednio w fosfonian **136** oraz amid kwasu fosforowego **137**.

Doktorantka podjęła również próby syntezy monosacharydów z wolną grupą hydroksylową w pozycji C3. Na drodze kilku przemian, dość standardowych w chemii cukrów, otrzymała z modyfikowanej glukozaminy **152** pochodną **155**, która posiadała niezabezpieczoną grupę OH w pozycji C4, zaś grupa 3-OH była blokowana łatwo usuwalnym kwasem lewulinowym. W ten sposób można nie tylko otrzymać pożądany docelowy związek (z wolną grupą 3-OH), ale również taki, posiadający potencjalne miejsce wiązania w innej pozycji (tu: 4-OH).

Otrzymane substraty Doktorantka połączyła ze sobą poprzez 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena (przemiana typu 'click') otrzymując szeroką gamę modyfikowanych monosacharydów.

Oczywiście nie przedstawiam tutaj wszystkich syntez, które Doktorantka wykonała w czasie swojej pracy (byłoby to bezcelowe), ale tylko wybrane, reprezentatywne przykłady. Na ich podstawie widać wyraźnie, że mgr Tomaszewska podeszła do zadania kompleksowo, otrzymując związki modyfikowane zarówno w grupie aminowej jak i na centrum anomerycznym.

W podsumowaniu pracy Doktorantka pisze: *'W niniejszej pracy zaprezentowano [kto zaprezentował ??] wyniki badań ... Wprowadzone modyfikacje, w szczególności obecność w strukturze fluorowanego łańcucha o różnej ilości [chyba liczbie] atomów wodoru umożliwiłyby przenikanie przez lipofilowe błony komórkowe'*. Jest to jak najbardziej prawdziwe, jednak należałoby podać, jak te modyfikowane cukry umieścić w strukturze kwasu hialuronowego. Sformułowanie (str. 97): *'utworzenie koniugatu leku z rozpuszczalnym w wodzie polimerem daje nowe możliwości w poszukiwaniu nowych skutecznych metod terapii'* jest zbyt ogólnikowe.

Podsumowanie jest pisane w formie bezosobowej. Poza wspomnianym już przykładem znalazłem jeszcze kilka sformułowań typu: *'przeprowadzono syntezę'*, *'zaobserwowano'* itd. Uważam, że Doktorantka powinna to opisać w pierwszej osobie.

Mgr Tomaszewska otrzymała szereg rozmaicie sfunkcjonalizowanych pochodnych aminocukrów, które połączyła z łącznikami (fluorowanymi i niefluorowanymi) w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena zarówno w warunkach zaproponowanych przez Sharpless'a jak i Meldal'a.

Doktorantka stwierdziła również, że reakcję Arbuzov'a można, w przypadku pochodnych cukrowych, przeprowadzić w dość łagodnych warunkach w temp. nieprzekraczającej 65°C.

W ostatnim fragmencie podsumowania Doktorantka pisze: '*reasumując, zgodnie z celem pracy, przedstawiono [znów forma bezosobowa!] syntezę i zastosowanie nowych fluorowanych i niefluorowanych monosacharydów..*'. Jeśli chodzi o syntezę jest to prawda; mgr Tomaszewska przedstawiła syntezę całej gamy modyfikowanych monosacharydów. Nie mogę zgodzić się natomiast ze stwierdzeniem, że przedstawiono ich zastosowanie, tym bardziej, że w ostatnim zdaniu podsumowania pisze: '[związki te] moga być wykorzystane jak bloki budulcowe....'

Część eksperymentalna napisana jest starannie i pozwala na odtworzenie przeprowadzonych syntez. Brakuje mi jednak wyników analizy elementarnej; wszędzie są podane tylko pomiary HRMS, które nic nie mówią o czystości produktu. Podawanie wartości pomiaru skręcalności właściwej z dokładnością do 0.01 nie ma sensu, gdyż sama dokładność metody wynosi kilka procent. Również stężenie próbki powinno być podana do max. 0.1.

Dziwne parametry znalazłem w charakterystyce widmowej kilku produktów, np. **56** czy też **58**, gdzie zmierzono stałe sprzężenia dla protonu H-2 > 19 Hz. Otóż takie sprzężenia w związkach cukrowych nie występują. Proton H2 w glukozaminie ma sprzężenie do H1 (tu podano poprawnie: $J = 8.7$ Hz) oraz H3 i NHCOR. Sprzężenie H2-H3 wynosi ok. 9 Hz, nieco inne jest sprzężenie do NH, ale skąd pojawia się wartość 19.2 Hz?? Nie jest to raczej błąd komputerowy gdyż podane wartości sprzężeń wahają się od 19.2 (dla związku **58**) poprzez 19.7 (**56**) do 19.3 Hz (**59**).

Sygnal protonu H1 w związku **139** z wolną grupą OH w pozycji C1 jest trypletem (raczej dd) o stałej sprzężenia 3.9 Hz, co sugeruje, że związek ten występuje wyłącznie jako anomer α . Jest to raczej dziwne, gdyż wolne cukry (tzn. z niezabezpieczoną grupą OH w pozycji anomerycznej) są zwykle mieszaninami α/β anomerów. We wzorach związków **158**, **159**, oraz **160** (str. 88, 89 dyskusja wyników) pozycje 4,6-glukozaminy są zabezpieczone acetalem benzyldenowym. Dlaczego w opisie ich preparatyki pojawia się aldehyd anyżowy?? Dane fizykochemiczne produktu **158** (str. 153) jednoznacznie potwierdzają, że w cząsteczce jest zabezpieczenie benzyldenowe a nie reszta aldehydu anyżowego. W przypadku wielu syntez (np. **173-175**) otrzymano produkty '*jako ciało stałe*'. Wypadałoby podać ich temperatury topnienia.

Na zakończenie Doktorantka zamieszcza katalog widm NMR wybranych produktów, co bardzo ułatwia identyfikację.

Wykaz stosowanych skrótów i symboli jest stanowczo zbyt rozbudowany. Doktorantka podaje tutaj tzw. 'oczywiste oczywistości' jak np. CHCl_3 – chloroform; $\text{P}(\text{OEt})_3$ – fosforin trietylu; czy NMR – magnetyczny rezonans jądrowy. To tylko nieliczne przykłady.

Mimo tych raczej drobnych uwag polemicznych, pracę mgr Joanny Tomaszewskiej oceniam pozytywnie. Osiągnęła ona wiele wartościowych wyników poszerzających naszą wiedzę w chemii cukrów, a w szczególności fluorowanych cukrów i ich pochodnych. Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka wykazała się dużą pracowitością, inwencją naukową i dociekliwością. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie warunki ustawy i wnoszę o dopuszczenie magister Joanny Tomaszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.