



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 10.04.2015



Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Komor pt.

”Badania nad otrzymywaniem i zastosowaniem cukrów nienasyconych w syntezie glikokoniugatów”

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej
pod kierunkiem profesora Wiesława Szeji

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach projektów POIG oraz POKL.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Katarzyny Komor ma charakter klasyczny i składa się z krótkiego wstępu, części literaturowej, omówienia wyników własnych, podsumowania oraz części doświadczalnej i spisu literatury (257 pozycji). Ponadto pod koniec rozprawy znajduje się krótki aneks ze wzorami wszystkich związków otrzymanych przez doktorantkę jak również wykaz stosowanych skrótów i akronimów. Uważam, że ten ostatni spis jest stanowczo zbyt rozbudowany. Nie ma bowiem potrzeby definiowania skrótów powszechnie znanych i stosowanych ‘na co dzień’ takich jak np.: Ac, Bn, DMF, DMSO, ^1H NMR czy ^{13}C NMR (oraz wiele innych). W sumie praca liczy 198 stron.

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy było opracowanie nowych rozwiązań syntetycznych przydatnych w konstruowaniu glikozydów o złożonej budowie. Jak pisze doktorantka: *„koncepcja opierała się na założeniu, że na drodze konwergentnej syntezy można uzyskać bibliotekę cukrów i konstruktów (??) związków biologicznie aktywnych”*. Trzeba stwierdzić, że postawione przed sobą zadanie doktorantka wykonała z powodzeniem.

Węglowodany to, obok białek i kwasów nukleinowych, najbardziej rozpowszechniona grupa związków naturalnych odpowiedzialnych za rozpoznanie na poziomie komórkowym. Pełnią one kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów oraz działaniu układów biologicznych. Dotyczy to m.in. stanów zapalnych, adhezji komórek, a także infekcji pasożytniczych, wirusowych i bakteryjnych. Opis mechanizmów niektórych procesów dał przesłanki do projektowania i syntezy skutecznych leków i stymulował badania nad pełniejszym określeniem funkcji cukrów w procesach biologicznych.

Zaawansowane badania pozwalające na określenie funkcji biologicznych wymagają zwykle dość znacznych ilości materiału o bardzo wysokiej czystości, w szczególności czystości diastereoizomerycznej. Nie zawsze jest możliwe uzyskanie wystarczająco czystych związków ze źródeł naturalnych. Istnieje kilka klasycznych już metod glikozylacji (metoda Garegga, Schmidta czy Fraser-Reida) pozwalających na otrzymanie pożądanego di- czy oligosacharydu. Wciąż jednak poszukujemy nowych metodologii pozwalających na dogodną, prostą i efektywną syntezę związków biologicznie aktywnych, zarówno tych istniejących w świecie ożywionym jak również ich modyfikacji (mimetyków).

Ta gałąź chemii węglowodanów – poszukiwanie nowych, efektywnych metod glikozylowania – jest intensywnie rozwijana w grupie prof. Wiesława Szeji. Praca mgr Komor sytuuje się w tym nurcie i stanowi twórcze rozwinięcie tej tematyki. Praca jest monotematyczną rozprawą dotyczącą chemii i właściwości bardzo interesującej grupy związków, glikokoniugatów. Szczególny nacisk jest położony na opracowanie nowych metod syntezy takich połączeń w oparciu o nienasycone cukry.

Przegląd literaturowy opisuje nie tylko chemię cukrów (zarówno prostych jak i bardziej złożonych) ale również ich rolę w procesach biologicznych. Autorka wyczerpująco omawia reakcje glikozylowania kładąc nacisk na stereochemię tworzenia nowych wiązań pomiędzy centrum anomerycznym jednego partnera i wybraną grupą hydroksylową drugiego. Omawiane są reakcje S_N1 oraz S_N2 jak również otrzymywanie produktów glikozylacji z glikali. Dość obszernie doktorantka omawia metody syntezy glikali jak również ich zastosowanie w reakcji Ferriera. Nie będę szczegółowo analizował tej części, gdyż przedstawia ona dość dobrze znane metody poparte właściwym (i ‘obfitym’) cytowaniem źródeł literaturowych. Choć uważam, że część literaturowa jest chwilami zbyt szczegółowa, stanowi ona jednak bardzo dobre wprowadzenie w badania własne mgr Komor. Mam tylko pewne zastrzeżenia do rozdziału II.5 (str. 58-60) zatytułowanego: ‘*Kataliza przeniesienia fazowego.*’ Wśród odnośników literaturowych cytowanych w tym podrozdziale **tylko jeden** (nr 208: M. Mąkosza, I. Kryłowa, *Tetrahedron*, **1999**, 6395-6402) odnosi się do twórcy metody PTC prof. Mieczysława Mąkoszy. Warto by chyba zacytować również jeden z przeglądów ‘popołnionych’ przez autora tej metodologii.

Doktorantka w ramach swej pracy zajęła się najpierw syntezą glikali (w tym również selektywnie zabezpieczonych), które stanowiły substraty w planowanych syntezach. Wydaje mi się, że ta część jest zbyt szczegółowa, gdyż te substraty są znane. Dlatego dziwi mnie stwierdzenia w części ‘**omówienie wyników**’ typu: ‘*Strukturę glikali R2, R3, F5, A5 oraz ich czystość potwierdzono na podstawie analizy widm 1H NMR, ^{13}C NMR oraz wyznaczeniu skręcalności właściwej, które były zgodne z danymi literaturowymi*’ (str. 65) czy też szczegóły eksperymentalne np.: ‘*po 1 godzinie mieszaninę reakcyjną zneutralizowano za pomocą kationitu Amberlyst 15 ...*’ (też str. 65).

W dalszych krótkich podrozdziałach (III.1.3 oraz III.1.4) doktorantka omawia syntezę kolejnych substratów pochodnych genisteiny i urydyny. Właściwe badania mgr Komor opisuje dalej począwszy od rozdz. III.2 ‘*Glikale jako donory glikozylowe*’. Nie będę ich szczegółowo omawiał; wskażę tylko na najbardziej istotne osiągnięcia doktorantki. Wychodząc z acetylowanego

L-ramnalu (**R1**) otrzymała ona odpowiednie 2,3-nienasycone cukry **R6** (głównie izomer α), które przekształciła w selektywnie blokowane pochodne **R8** i **R9**. Niestety, znów doktorantka nie uniknęła podania informacji o szczegółach eksperymentalnych, np. (str. 71): „wykonano i interpretowano widma $^1\text{H NMR}$ oraz $^{13}\text{C NMR}$ ”.

Kolejny rozdział przedstawia ciekawą przemianę L-ramnalu **R1** w di-sacharyd **R11**, w którym dwie jednostki 2,3-nienasyconego cukru są połączone wiązaniem glikozydowym pomiędzy anomerycznymi atomami węgla. Propozycja mechanizmu jest przedstawiona w Schemacie 88 (str. 73). Acetylowany L-ramnal **R1** ulega najpierw przegrupowaniu Ferriera (z cząsteczką H_2O) do 2,3-nienasyconego cukru (**R10**), który następnie - w reakcji z wyjściową cząsteczką glikalu **R1** - daje disacharyd **R11**; temu związkowi przypisano konfigurację α,α na podstawie widma NMR. Czy autorka przeanalizowała również (raczej mało prawdopodobną) strukturę β,β ? (struktura α,β jest oczywiście niemożliwa ze względu na symetrię obserwowaną w widmie NMR). Na str. 74 podano następujące dane: $\delta = 5.37$ ppm; $J_{1,2} = 2.8$ Hz co dowodzi, wg doktorantki, konfiguracji α,α dla **R11**. Na str. 75 mgr Komor pisze: „Na widmie NOESY związku **R11** zaobserwowano słabe sygnały pomiędzy protonem przy węglu anomerycznym (H-1) a protonami H-2 i H-5 co wskazuje na utworzenie diastereoizomeru o konfiguracji α,α .” Obliczenia wskazały również, że w izomerze β,β odległości H1-H5 oraz H1-H4 są znacząco większe co wyklucza ten izomer. Jak wiarygodne są jednak te dane?. Dużo bardziej czytelną byłaby informacja, że konfigurację α dla związku **R15** określono za pomocą X-ray (str. 86) i przez analogię (popartą obliczeniami MM2) przypisano strukturę α,α również związkowi **R11**.

W dalszej części mgr Komor opisuje syntezy disacharydów o wiązaniu 1,3-O-glikozydowym. Wydajności produktów są bardzo umiarkowane (Tabela 19 str. 80); również selektywności (α,β) pozostawiają wiele do życzenia. Dopiero reakcja glikozylowania przeprowadzona w warunkach PTC znacząco poprawia te wyniki. Wydajności produktów wynoszą ok. 50% i powstaje w znaczącej przewadze (poza jednym przypadkiem) anomer α (Tabela 23 str. 88).

Otrzymane powyżej prekursorzy poddano dalszej funkcjonalizacji otrzymując szereg ważnych klas związków takich jak: 2-deoksy-, 2-deoksy-2-jodo-, 2-amino-2-deoksy-cukry. Otrzymano również szereg 2,3-anhydrocukrów oraz odpowiednich dioli w reakcjach *cis*- oraz *trans*-dihydroksylacji. Te przemiany są wyczerpująco omówione w rozdz. III.3 oraz III.4. Uważam, że doktorantka otrzymała wartościowe wyniki będących podstawą do realizacji końcowego celu jakim była synteza glikokoniugatów wybranych, biologicznie aktywnych związków (rozdz. III.5).

Mgr Komor otrzymała pochodne genisteiny, w których ten flawonoid jest połączony trójwęglowym linkerem z pozycją anomeryczną cukru (np. **RGen1** i inne). W podobny sposób otrzymała doktorantka pochodne urydyny (rozdz. III.6). Obie grupy pochodnych poddano ocenie aktywności biologicznej, co jest opisane w podrozdziale III.5.1.1 i III.6.2.3. Przeprowadzono badania mechanizmu hamowania proliferacji komórek HCT 116 raka jelita grubego wobec otrzymanych pochodnych genisteiny. Analizowano rolę różnych podstawników w reszcie cukrowej oraz dodatkowego pierścienia epoksydowego w konfiguracji *cis* lub *trans*. Przeprowadzone badania wskazały,

że niektóre glikokoniugaty zawierające grupę epoksydową w cząsteczce cukru hamują proliferację komórek nowotworowych przy niższym stężeniu niż związek wiodący (**Ram-3**). Wśród nowych pochodnych, szczególnymi właściwościami odznaczają się związki zawierające ugrupowanie *tert*-butylodimetylosililowe. Silną toksycznością charakteryzują się zarówno związki zawierające epoksyd (**RGen6**, **RGen9**), jak i ich analog nie zawierający pierścienia epoksydowego (**RGen3**), które indukują masową apoptozę komórek już w pierwszych 24 godzinach od podania badanej substancji.

Dokładny opis tych doświadczeń znajduje się w części ‘omówienie wyników’ (jest również podany w części eksperymentalnej). Bezosobowa forma opisu może sugerować, że te wyniki zostały uzyskane w wyspecjalizowanym laboratorium biochemicznym. Czy tak było istotnie? Na podstawie lektury pracy trudno mi to stwierdzić, bowiem cała praca jest napisana w formie bezosobowej.

Nie będę szczegółowo omawiał wszystkich osiągnięć doktorantki i skoncentruję się na uwypukleniu najistotniejszych z nich. Do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

- Wykazanie, że 2,3:2',3'-di-nienasycone disacharydy zawierające wiązanie 1,1'- α,α -*O*-glikozydowe, pochodne bardzo reaktywnych 6-deoksypiranoz, można otrzymać wysoce stereoselektywnie w reakcji przegrupowania Ferriera. W tym procesie powstają disacharydy o zdefiniowanej konfiguracji α przy centrach anomerycznych obu jednostek cukrowych.
- Zaproponowanie mechanizmu reakcji glikalu z wolną grupą hydroksylową 3-OH w warunkach przegrupowania Ferriera, która nie prowadziła do oczekiwanego disacharydu o wiązaniu 1,3-*O*-glikozydowym lecz do 1,1-disacharydów.
- Opracowanie oryginalnej metody syntezy disacharydów, w których 2,3-nienasycony cukier połączony jest wiązaniem 1,3-*O*-glikozydowym z cząsteczką cukru 1,2-nienasyconego (glikalu) oraz zaproponowanie mechanizmu tej przemiany.
- Opracowanie metody syntezy serii glikokoniugatów genisteiny będących analogami biologicznie aktywnego związku **Ram-3**.

Moją wysoką ocenę pracy mgr Komor obniża nieco trochę ‘niefrasobliwy’ opis. Przede wszystkim w części ‘omówienie wyników’ podanych jest bardzo wiele szczegółów eksperymentalnych, które na pewno nie ułatwiają śledzenia toku rozprawy. Przykładowo (str. 65) jest następująca akapit: „*W pierwszym etapie przeprowadzono hydrolizę estrowych grup ochronnych glikalu metanolanem sodu w metanolu. Po 1 godzinie mieszaninę reakcyjną zneutralizowano za pomocą kationitu Amberlyst 15 i po odsączeniu jonitu zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie odbezpieczony glikal poddano reakcji alkilowania bromkiem benzylu wobec NaH w DMF. Po 5 godzinach produkt reakcji wydzielono metodą ekstrakcji do octanu etylu oraz oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej otrzymując glikal **R5** z wydajnością 75% w postaci bezbarwnego syropu, którego czystość potwierdzono przez porównanie z danymi literaturowymi.*” Co te szczegóły wnoszą w części opisującej badania własne??

Znaczna część otrzymanych związków nie jest w pełni poprawnie scharakteryzowana. Brak jest oznaczeń analizy elementarnej potwierdzającej czystość produktów; w takich przypadkach należy podawać wartości uzyskane w HRMS a tych często brak. Podawane są tylko dane z LRMS, lub w ogóle brak wyników analizy *ms* (np. **R4**, **R6 α** i **R6 β** , **R7-R9**). Ponadto wydaje mi się, że niektóre preparatyki powszechnie znanych związków, które nie proponują żadnych zmian w stosunku do tych opisanych w podręcznikach, powinny być pominięte [np. odbezpieczenie handlowego tri-*O*-acetylglukalu (**G1**) w warunkach Zemplena (str. 130) i tym podobne]

Kilka uwag szczegółowych:

- Związek przedstawiony na rys. 4 (str. 37), *neodysiherbaina*, jest pochodną L-aminokwasu. Dlaczego zatem związek **34** w Schemacie 33 (str. 37) zatytułowanym '*Fragment syntezy 10-hydroksymetylo-neodysiherbainy A*' ma konfigurację D- we fragmencie aminokwasowym?
- Nieprecyzyjne jest stwierdzenie (str. 14): „Ze względów termodynamicznych często preferowany jest atak z utworzeniem produktu o konfiguracji α . Jest to spowodowane tak zwanym efektem anomerycznym, który polega na utworzeniu produktu o niższej energii, a zatem bardziej stabilnego.” Efekt anomeryczny nie polega na tworzeniu produktu o niższej energii, tylko ten produkt powstaje dzięki istnieniu tego efektu.
- W opisie niektórych związków są bardzo duże rozbieżności pomiędzy danymi zmierzonymi przez doktorantkę a literaturowymi. Np. (str. 127) dla związku **R2** podano następujące dane: $[\alpha]_D = + 29.9$ (c 0.67, CHCl_3); lit.: $[\alpha]_D = + 55.77$ (c 1.15, AcOEt). Jeszcze większa różnica jest dla związku **F4**. Czyżby zmiana rozpuszczalnika skutkowała aż tak wielką różnicą? Chyba nie, gdyż dla związku **R3** (str. 128) skręcalność zmierzona przez mgr Komor w chloroformie jest identyczna jak literaturowa, zmierzona w octanie etylu.
- Autorka używa często dość dziwnych tworów językowych jak np. wielokrotnie powtarzane słowo **konstrukt**; wg słownika języka polskiego słowo **konstrukt** oznacza (w filozofii) logiczny wytwór umysłu. Inne dziwne określenia to 'lipofilne' (chyba lipofilowe?) czy grupa niepartycypująca (powinno być nieuczestnicząca).
- Co to są 'widma spektroskopowe'?? (spectrum = widmo)

Mgr Komor pisze pracę doktorską w formie bezosobowej. Np. '*zdecydowano się na zmianę katalizatora*' '*wykorzystano glikal z wolną allilową grupą.*' itd.

Mimo tych raczej drobnych (poza może niepełną charakterystyką produktów) uwag polemicznych pracę mgr Katarzyny Komor oceniam bardzo pozytywnie. Osiągnęła ona wiele wartościowych wyników poszerzających naszą wiedzę w chemii cukrów. 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 inż. Katarzyny Komor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.