

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
dr hab. Dorota Gabriela Piotrowska, prof. nadzw. UMed

Łódź 27 stycznia 2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Anny Jakubowskiej

**p.t. „*Badania nad otrzymywaniem nowych stereoizomerów α -aminokwasów
z wykorzystaniem równoważnika glicyny*”**

**przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu
Jagiellońskiego – Collegium Medicum w celu uzyskania stopnia doktora
nauk farmaceutycznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku, w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kulig, prof. nadzw. UJ, której tematyka badawcza koncentruje się wokół poszukiwań modyfikowanych aminokwasów m.in. jako potencjalnych inhibitorów receptorów NMDA.

Naturalne aminokwasy stanowią element budulcowy związków wielkocząsteczkowych takich jak peptydy i białka. Poszukiwanie ich nienaturalnych odpowiedników, w tym cyklicznych aminokwasów zawierających czwartorzędowy atom węgla α stało się ważnym kierunkiem badań współczesnej chemii medycznej odkąd wykazano, że wprowadzenie ich w strukturę peptydu wywołuje istotne zmiany konformacyjne. Wpływ takich zmian na aktywność biologiczną badanych połączeń jest dobrze udokumentowany, a cykliczne aminokwasy wprowadzono z powodzeniem zarówno do prostych cząsteczek otrzymując leki zawierające kilka reszt aminokwasów (np. simeprewir, ibodutant), jak i do wielkocząsteczkowych.

Studia nad syntezą enancjomerycznie czystych cyklicznych aminokwasów, które podjęła pani mgr Jakubowska doskonale wpisują się w ten obszar badań z pogranicza farmacji i chemii, który uważam za ważny i wysoce aktualny zarówno z punktu widzenia poznawczego (synteza asymetryczna), jak i aplikacyjnego w aspekcie poszukiwania związków o określonej aktywności biologicznej.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Przedstawiona do recenzji praca ma układ klasyczny, powszechnie przyjęty dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym. Dysertację rozpoczęto wprowadzeniem w problematykę badawczą, w którym Doktorantka przekonująco wyjaśnia rolę nienaturalnych aminokwasów w poszukiwaniu nowych leków. Podane zostały przykłady stosowanych terapeutyków, pochodnych aminokwasów, a w dalszej części przedyskutowano najczęściej stosowane strategie syntezy α -aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem reakcji wykorzystujących równoważniki glicyny. Rozdział ten stanowi doskonałe wprowadzenie w podjęty wątek badawczy i jest krytycznym przeglądem dotychczasowych osiągnięć w zastosowaniach znanych równoważników glicyny w syntezach α -aminokwasów opublikowanych przez Doktorantkę i Promotora w *Current Organic Chemistry* w 2013 roku.

„Badania własne” poprzedzone zostały krótkim podrozdziałem zatytułowanym „Założenia i cel pracy”, w którym mgr Jakubowska przekonująco zdefiniowała poszczególne cele badawcze. Doktorantka podjęła się trudnego zadania syntezy enancjomerycznie czystych pochodnych kwasów 1-aminocyklopentano-, 1-aminocyklobutano- oraz 1-aminocyklopropano-1-karboksylowych. Na podstawie analizy literatury przedmiotu autorka zaproponowała, że najdogodniejszą metodą syntezy tych związków będzie zastosowanie pochodnej oksazynonu (jako równoważnika glicyny) w reakcji z odpowiednio wyselekcjonowanymi odczynnikami dwufunkcyjnymi – chlorowcowymi pochodnymi cyklicznych siarczynów i siarczanów.

W pierwszej kolejności Doktorantka zajęła się próbami optymalizacji warunków syntezy enancjomerycznie czystych równoważników glicyny, podstawionych 3,6-dihydro-1,4-oksazyn-2-onów pochodnych, kwasów (*R*)- i (*S*)-2-hydroksy-2,3,3-trimetylobutanokarboksylowych, znanych jako odczynniki Wannera. W opisanej w literaturze kilkietapowej syntezie najtrudniejszym etapem jest cyklizacja kwasu 2-(glicyloksy)-2,3,3-trimetylobutanowego w obecności odczynnika Mukaiyamy. Problem niskiej wydajności produktu cyklizacji Doktorantka początkowo postanowiła rozwiązać zastępując odczynnik Mukaiyamy innymi reagentami takimi jak DCC, EDCI i BOP, a następnie kierując się względami ekonomicznymi podjęła próby otrzymania łatwiej usuwalnych form odczynnika Mukaiyamy w postaci soli pirydyniowych osadzonych na żywicy Wanga albo dobrze rozpuszczalnych polimerów glikolu etylenowego. Ten fragment prac, mimo że nie został zakończony spektakularnymi osiągnięciami, świadczy o doskonałej znajomości nowoczesnych trendów w chemii organicznej tj. przykładów dołączania różnych odczynników do nośników w fazie stałej oraz zastosowania cieczy jonowych. Idea stosowania tak modyfikowanych reagentów zakłada z jednej strony ich pełną regenerację po reakcji, a dodatkowo istotne ograniczenie użycia rozpuszczalników organicznych, co doskonale wpisuje się w nurt „zielonej chemii”. Dowodzi to, że w swoich pracach Doktorantka nie

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



ogranicza się do korzystania ze znanych i sprawdzonych procedur, ale potrafi je także racjonalnie modyfikować.

Spośród serii 16 wyselekcjonowanych do badań odczynników dwufunkcyjnych Doktorantka otrzymała z dobrymi wydajnościami siedem halogenowych pochodnych cyklicznych siarczynów i siarczanów, w tym pięć nieopisanych wcześniej w literaturze oraz siedem nowych pochodnych metoksylowych, z których większość stanowiły związki enancjomerycznie czyste. Wszystkie odczynniki dwufunkcyjne Doktorantka wybrała w sposób logiczny i przemyślany z zamiarem zbadania różnic szybkości i selektywności reakcji z otrzymanym uprzednio chiralnym ekwiwalentem glicyny.

Dysponując enancjomerycznie czystymi równoważnikami glicyny oraz serią odpowiednio sfunkcjonalizowanych cyklicznych siarczynów i siarczanów mgr Jakubowska przystąpiła do realizacji właściwego celu pracy, którym była synteza cyklicznych aminokwasów. Prace rozpoczęła od optymalizacji warunków reakcji równoważnika glicyny z siarczynem, pochodną 4-jodobutano-1,2-diolu. Doktorantka ustaliła, że skuteczne generowanie karboanionu z równoważnika glicyny wymaga użycia bardzo mocnej zasady fosfazenowej P_4tBu , a nukleofilowa addycja karboanionu otrzymanego z równoważnika glicyny (*S*)-**1** do tlenku (*S*)-4-(2-jodoetylo)-1,3,2-dioksotiolanu przebiega z bardzo wysoką diastereoselektywnością z utworzeniem dwóch izomerycznych spiranowych produktów o konfiguracjach (2*S*,5*R*,8*S*) i (2*S*,5*S*,8*S*) w proporcji odpowiednio 94:6, zaś analogiczna reakcja z tlenkiem o konfiguracji *R* prowadzi do powstania diastereoizomerów o konfiguracjach (2*R*,5*R*,8*S*) i (2*R*,5*R*,8*R*) w stosunku 7:3.

Część pracy opisująca wyodrębnianie i identyfikację produktów zasługuje na szczególnie wysoką ocenę. Zsyntetyzowane związki rozdzielone zostały chromatograficznie (preparatywne HPLC), a konfiguracje absolutne ustalone zostały w oparciu o dwuwymiarowe eksperymenty Overhausera i w dwóch przypadkach dodatkowo potwierdzone badaniami rentgenostrukturalnymi. Zbyt małe, a zatem mało diagnostyczne różnice przesunień chemicznych odpowiednich grup w widmach pochodnych 5-(hydroksy)spiranowych wykonanych w deuterowanym chloroformie i DMSO- d_6 skłoniły mgr Jakubowską do przekształcenia badanych związków w pochodne 5-karbonylowe, a także odpowiednie estry z enancjomerami kwasu *O*-metylomigdałowego. W tym miejscu chciałabym zachęcić Doktorantkę do wykorzystania w przyszłości benzeno- d_6 jako rozpuszczalnika w badaniach strukturalnych techniką NMR, gdyż już przed rokiem 1970 zauważono bardzo duże różnice przesunień chemicznych w porównaniu z widmami w chloroformie-*d*. Przeprowadzony dowód strukturalny i ustalenia konfiguracji enancjomerów 5-(hydroksy)spiranowych nie budzą wątpliwości, a

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



Doktorantka wykazała się biegłością w interpretacji widm zarówno jedno- jak i dwuwymiarowych. Poprawność przeprowadzonej analizy nie budzi zastrzeżeń, choć czytelnik we fragmencie dotyczącym związku **57a** zmuszony jest opierać się jedynie na opisie przeprowadzonego przez Doktorantkę rozumowania, gdyż na rysunku 3.7, zapewne omyłkowo, zamieszczone zostało widmo HSQC (to samo co na rysunku 3.6) zamiast omawianego widma NOESY. Pomysł przekształcenia produktów 5-(hydroksy)spiranowych w odpowiednie estry *O*-metylomigdałowe w celu niezależnego potwierdzenia ustalonej konfiguracji absolutnej uważam za bardzo dobry i zasługujący na uznanie, choć Doktorantka dość lakonicznie podeszła do opisu tej części swoich badań, zamiast wyeksponować złożoność analiz porównawczych i ogrom wykonanej przez siebie pracy.

W oparciu o obserwacje eksperymentalne Doktorantka zaproponowała mechanizm tworzenia produktów spiranowych, uwzględniający kolejność alkiłowania równoważnika glicyny dwufunkcyjnym cyklicznym siarczynem. To szczególnie dobrze świadczy o krytycznym podejściu Doktorantki do analizy uzyskanych przez siebie wyników, umiejętności stawiania hipotez badawczych i wyciągania wniosków.

Spirozwiązki o konfiguracjach (2*S*,5*R*,8*S*) i (2*S*,5*S*,8*S*) przekształcone zostały w odpowiednie enancjomerycznie czyste kwasy (1*R*,3*S*)- i (1*S*,3*S*)-1-amino-3-hydroksycyklopentano-1-karboksylowe, a syntezę pozostałych dwóch stereoizomerów przeprowadzono w analogicznej sekwencji reakcji z użyciem równoważnika glicyny o konfiguracji (*R*).

Kolejnym dwufunkcyjnym odczynnikiem użytym w badanej reakcji był tlenek (*R*)-4-jodometylo-1,3,2-dioksotiolanu. Przez analogię do wcześniejszych eksperymentów Doktorantka założyła, że w wyniku reakcji z równoważnikiem glicyny nastąpi cyklizacja z utworzeniem czterocłonowego pierścienia (związek oznaczony w recenzowanej pracy jako **61**), a tak otrzymane produkty przekształcić będzie można w odpowiednie kwasy 1-amino-3-hydroksycyklobutano-1-karboksylowe. Modyfikując warunki reakcji otrzymano złożoną mieszaninę produktów. Doktorantka podjęła się zadania wyodrębnienia i identyfikacji jednego ze związków (związek **62**), którego w mieszaninie poreakcyjnej było zaledwie 5% i ustaliła, że w jego strukturze obecny jest fragment metylenocyklopropanu. Według Doktorantki tworzenie się związku **62** jest wynikiem „*odwodnienia związku 61*”. Zaproponowane przekształcenie, choć nie można go wykluczyć, zakłada przegrupowanie z utworzeniem nieklasycznego karbokationu. Zachęcam Doktorantkę do rozważenia mechanizmu zakładającego w pierwszym etapie alkiłowanie karboanionu jodkiem, a następnie ataku generowanego w drugim etapie nukleofila na węgiel C4 w 1,3,2-dioksotiolanie z utworzeniem produktu zawierającego fragment siarczanu cyklopropylometylowego. Jest to podejście o tyle prawdopodobne, że powstanie związku **62**

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Dorota

byłoby następstwem eliminacji z udziałem dobrej grupy opuszczającej, a wszystkie kolejne przekształcenia odbywałyby się w środowisku zasadowym.

Na wysoką ocenę zasługuje również część rozprawy poświęcona syntezie układów zawierających fragment cyklopropanu. Ważną obserwacją, jaką poczyniła mgr Jakubowska, było stwierdzenie, że w reakcjach podstawienia nukleofilowego z równoważnikiem glicyny tlenek 4-chlorometylo-1,3,2-dioksotiolanu nie jest wystarczająco reaktywny i dlatego zastąpiony został odpowiednim ditlenkiem. Doktorantka wykazała stereospecyficzny przebieg reakcji równoważnika glicyny (*S*)-**1** z ditlenkiem (*R*)-4-chlorometylo-1,3,2-dioksotiolanu, w wyniku której powstała spiranowa pochodna chlorometylocyklopropanu (*1R,3S,6S*)-**63a**, a jej konfigurację ustaliła w oparciu o eksperyment NOESY. Komentarza wymaga natomiast nieprecyzyjny opis analogicznej reakcji z ditlenkiem (*S*)-4-chlorometylo-1,3,2-dioksotiolanu. Doktorantka twierdzi, że reakcja przebiega stereoselektywnie, ale nie podaje proporcji tworzących się diastereoizomerów, co uniemożliwia ocenę stopnia stereoselektywności. Jeżeli powstaje jeden izomer, co wynika z analizy schematu 3.25, to reakcja jest stereospecyficzna. Jeżeli Doktorantka zdecydowała się na użycie w tym miejscu pojęcia „stereoselektywność”, to koniecznym jest podanie proporcji izomerów, bądź tak jak poprzednio zaznaczenie, że reakcja jest w pełni stereoselektywna.

Interesującym pomysłem jest użycie spiranowych pochodnych chlorometylocyklopropanu, związków **63**, jako dogodnych substratów w reakcjach nukleofilowego podstawienia atomu chloru, który Doktorantka dokumentuje na przykładzie przekształceń związku **63c** w odpowiednie pochodne 1-fenylopiiperazyny i ftalimidu. Doktorantka zbadała również reaktywność metoksyłowych pochodnych cyklicznych siarczanów, a następnie utworzone spiranowe pochodne (metoksyalkilo)cyklopropanów wykorzystała w syntezie enancjomerycznie czystych kwasów 1-amino-2-(metoksyalkilo)cyklopropano-1-karboksylowych.

Każdy z rozdziałów „*badań własnych*” kończy podsumowanie, w którym mgr Jakubowska krytycznie analizuje uzyskane wyniki, a następnie na tej podstawie planuje kolejne etapy badań.

Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z wielokierunkowością prowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje strona graficzna pracy i staranna korekta edytorska.



Dysertacja napisana została zrozumiałym językiem, choć Doktorantce nie udało się uniknąć kilku pomyłek i niezręcznych sformułowań, o których wspominam jedynie z obowiązku recenzenta:

- str. 25 – zamiast „*centrum chiralne*” precyzyjniej jest używać: „centrum chiralności”, a najlepiej „centrum stereogeniczne”;
- str. 28 – zgodnie z opisem w tekście, związki XXI to odpowiednie enancjomery estrów etylowych kwasu 2-metylo-1-aminocyklopropano-1-karboksylowego natomiast na schemacie znajdują się analogiczne estry metylowe kwasu 2-etylo-1-aminocyklopropano-1-karboksylowego;
- str. 39 – schemat 3.3 – zamiast (*R*)-**1** powinno być (*R*)-**2**, a we wzorze związku (*R*)-**8** zamiast „karbofenoksylowej” grupy powinna być karbobenzoksylowa (Cbz) grupa ochronna;
- str. 59/rysunek 3.4 – numeracja pod wzorem: zamiast **55a** powinno być **56a**;
- str. 67 – związek **58** to kwas α -metoksyfenylooctowy (kwas *O*-metylomigdałowy), a nie „kwas *a*-metylofenoksyoctowy”;
- str. 79/schemat 3.26 – zamiast skrótu SM (syntezator mikrofalowy) w warunkach reakcji lepiej byłoby użyć skrótu MW (promieniowanie mikrofalowe) – istotne w warunkach reakcji jest bowiem nie tyle samo urządzenie, co wytwarzane przez nie promieniowanie;
- część eksperymentalna – ze względu na ograniczoną rozdzielczość komputerową wykonanych widm ^1H NMR stałe sprzężenia powinny być podane z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Powyższe uwagi dotyczą pojedynczych uchybień i w żadnym stopniu nie zmniejszają merytorycznej wartości tej części pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Pochwalić należy umiejętność planowania prac eksperymentalnych. Ogromna pracowitość i konsekwencja w rozwiązywaniu problemów badawczych potwierdzają ogromną dojrzałość naukową mgr Jakubowskiej.



Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Jakubowskiej spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym...). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań, aktualność tematyki badawczej, a przede wszystkim dotychczasowy dorobek naukowy, na który składa się 7 publikacji o sumarycznym IF=12,509 (MNIŚW=165), zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum z wnioskiem o wyróżnienie pracy.