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 , 25.08.2015

Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Romana Komora pt.

"Badania nad syntezą i wstępną oceną właściwości biologicznych glikokoniugatów, pochodnych nukleozydów"

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej
pod kierunkiem profesora Wiesława Szeji
promotor pomocniczy: dr inż. Gabriela Pastuch-Gawołek

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. Romana Komora ma charakter klasyczny i składa się z krótkiego wstępu, części literaturowej, omówienia wyników własnych, podsumowania oraz części doświadczalnej i spisu literatury: aż 454 pozycje !!! Czy naprawdę wszystkie pozycje są konieczne? Czy doktorant je starannie przeczytał i przeanalizował? Mogę mieć pewne wątpliwości: np. na str. 15 znajdujemy następujący tekst: „*Boons i wsp. opracowali metodę wykorzystującą grupy zabezpieczające pozycję C-2, które zdolne są do wywołania efektu grupy partycypującej prowadzącej do otrzymania 1,2-cis glikozydów.*[41–43] *W trakcie aktywacji donora podstawnik (S)-fenylotiometylobenzylowy w pozycji C-2 atakuje jon oksokarbeniowy z utworzeniem stabilnego bicyklicznego układu trans-dekaliny wymuszając atak akceptora od dołu pierścienia.*" Cytowane odnośniki [41-43] nie do końca są właściwe. Odn. [41] (*ACIE,* **2005**) dotyczy kwasu migdałowego (a nie reszty fenylotiometylobenzylowej) a odn. [43] (*OL*) pochodzi nie z roku 2010 tylko 2011. Cała rozprawa doktorska mieści się aż na 221 stronach (+ kilka stron suplementu).

Cukry pełnią bardzo ważną rolę w procesach biologicznych. Ich połączenia z białkami (glikoproteiny) oraz lipidami (glikolipidy) są odpowiedzialne za przekazywanie informacji między komórkami oraz ich organizację w odpowiednie tkanki. Takie związki odpowiadają również za rozpoznanie międzykomórkowe, embriogenezę, regulację hormonalną oraz działanie układu immunologicznego. Ingerencja w proces glikozylacji może spowodować zablokowanie aktywności glikopeptydów lub glikolipidów. Pozwala to na zahamowanie procesu tworzenia się specyficznych glikokoniugatów na powierzchni mikroorganizmu, co uniemożliwia jego interakcję z komórkami gospodarza i tym samym zablokowanie adhezji, czyli pierwszego etapu infekcji.

Ta gałąź chemii węglowodanów - synteza analogów inhibitorów enzymów, jak również poszukiwanie nowych, efektywnych metod syntezy glikokoniugatów – jest intensywnie rozwijana w grupie prof. Wiesława Szeji.

Tą 'gorącą' tematyką zajął się mgr inż. Roman Komor w swojej pracy doktorskiej. Jej celem była synteza takich analogów glikozylotransferaz, które mogłyby inhibować działanie naturalnych enzymów. Doktorant postanowił opracować dogodną metodykę otrzymywania glikokoniugatów, które zawierałyby w swojej strukturze elementy składowe naturalnych substratów glikozylotransferaz. Według koncepcji doktoranta, cząsteczka takiej pochodnej nukleozydu powinna zawierać: część cukrową, linker i nukleozyd lub część go imitującą – acykliczną pochodną nukleozydu.

Część literaturowa rozprawy zaczyna się od ogólnych rozważań na temat reakcji glikozylowania: mechanizmu tej przemiany oraz czynników wpływających na jej przebieg. Kolejno doktorant analizuje wpływ grup zabezpieczających i odchodzących na selektywność procesu oraz starannie dyskutuje warunki reakcji (wpływ rozpuszczalnika, promotora/aktywatora, temperatury). Po tym stosunkowo krótkim wprowadzeniu, zajmuje się omówieniem syntezy tioglikozydów (rozdział **2.2**; str. 20 i dalsze). Doktorant wybrał tę grupę pochodnych gdyż - jak słusznie pisze na str. 67 (w części: omówienie wyników) – „*S*-glikozydy wykazują większą odporność na hydrolizę kwasową, zasadową i enzymatyczną niż odpowiednie *O*-glikozydy".

Najistotniejszym zadaniem jest oczywiście wysoce stereoselektywna synteza, mająca na celu otrzymanie albo anomeru α albo β w zależności od potrzeb. O ile synteza per-acetylowanych tioglikozydów, pochodnych glukozy lub galaktozy, o konfiguracji β jest stosunkowo prosta (udział estrowej grupy sąsiadującej w pozycji C-2) o tyle synteza anomerów α jest znacznie bardziej wymagająca. Rozdział **2.2.1.1** omawia ten pierwszy przypadek. Na str. 22 doktorant pisze: „per-*O*-acetylowana aldoza z tiolem daje glikozyd β (schemat 10)." Dlaczego jednak w schemacie 10 (str. następna) jest przedstawiona pochodna 2,3,4-tri-*O*-benzylowa? Kolejne rozdziały omawiają syntezy pochodnych zawierających zabezpieczenia zarówno estrowe jak i eterowe [alkilowe (głównie benzylowe) czy sililowe]. Doktorant opisuje wykorzystanie glikali (schemat 16) i ditioacetali (schemat 11) w syntezie tioglikozydów. Kolejny rozdział to wykorzystanie anhydrocukrów, w strukturę których „*jest uwikłany atom tlenu*" (str. 30; co to znaczy??). Następne podrozdziały omawiają syntezy poprzez sole pseudotiouroniowe (izotiouroniowe) i inne pochodne siarkowe (np. izocyjaniany, disiarczki itp.). Następnie mgr Komor omawia glikozylotransferazy i ich inhibitory (rozdziały **2.3** i **2.4**). Wydaje mi się, że szczególnie w rozdziale **2.4.** doktorant podaje zbyt szczegółowe informacje dotyczące inhibicji (Tabela 1. str. 49-52). Ostatni podrozdział części literaturowej zajmuje się zagadnieniem tworzenia wiązania amidowego.

Uważam, że mimo tych (raczej drobnych) zastrzeżeń przegląd literaturowy jest bardzo dobrym wprowadzeniem do części opisującej wyniki własne i znakomicie ułatwia ich śledzenie.

Omówienie wyników własnych mgr Komor rozpoczyna od opisu syntez substratów (z zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi): 1-tio-**D**-gluko- oraz 1-tio-**D**-galakto-piranoz. Wysoce selektywna synteza obu tych pochodnych została zrealizowana na drodze reakcji odpowiednich bromków

glikozylowych z tiomocznikiem i następczej hydrolizie soli izotiouroniowych (rozdział **3.1.1.1**). Reakcja zabezpieczonych piranoz (**11** i **12** str. 69) z odczynnikiem Lawesson'a dawała mieszaniny anomerów α/β z dużo gorszymi wydajnościami niż literaturowe co obrazuje Tabela 4 na str. 71. Ponadto selektywności były 'odwrotne' niż w literaturze; np. mgr Komor uzyskał 46% produktu **13** z przewagą izomeru β podczas w oryginalnej pracy (B. Davis, *ACIE* **2006** r) wydajność wynosi 82% z przewagą anomeru α. Niezbyt przemawia do mnie uzasadnienie tych rozbieżności: „*Różnice mogą być spowodowane trudnościami w przerobie mieszaniny poreakcyjnej, ponieważ w reakcji oprócz pożądanych produktów tworzy się jeszcze znaczna ilość produktów ubocznych, których obecność można zaobserwować podczas analizy TLC. W miarę postępu reakcji produktów ubocznych przybywało, dlatego zdecydowano* [kto zdecydował?] *o przerwaniu reakcji.*"

Inna metoda syntezy 1-tio-piranoz bazowała na wykorzystaniu 1,6-anhydro-cukrów: glukozy i galaktozy. Wydaje mi się, że doktorant niepotrzebnie opisuje procedurę benzylowania lewoglukozanu (produkt tej reakcji jest związkiem handlowym); jeśli jednak już to robi, to powinien podać oryginalne źródło lub choćby pracę przeglądową. Tymczasem na str. 77 doktorant cytuje trzy artykuły z lat: 2003, 2008, 2011 (odn. [392, 393, 412]) natomiast nie cytuje artykułu starszego o ponad 20 lat (H. Paulsen, *Chem. Ber.* 1981 str. 3079) gdzie ta preparatyka została opisana.

Mając 'w ręku' odpowiednie cukry z grupą tiolową w pozycji anomerycznej doktorant użył je w syntezie odpowiednich tioglikozydów (rozdział **3.1.1.4**; str. 78 i dalej). W reakcji 1,6-anhydro-cukrów z 2-merkapto-5-nitropirydyną otrzymał odpowiednie α-tioglikozydy **29** i **30** (str. 83) choć z bardzo umiarkowaną wydajnością (Tabela 12 str. 84). Niewątpliwie ta metoda jest dużo mniej korzystna niż metoda opisana nieco wcześniej (str. 82, Tabela 11) bazująca na reakcji 2-chloro-5-nitro-pirydyny z odpowiednim 1-tio-cukrem otrzymanym *in situ* z cukru z wolną pozycją anomeryczną. Grupę nitrową w tych pochodnych doktorant poddał redukcji do aminowej otrzymując w ten sposób pierwszy 'klocek swojej układanki'.

W następnych rozdziałach są przedstawione kolejne fragmenty związków docelowych. W rozdziale **3.1.3** opisana jest synteza siedmiu acyklicznych pochodnych uracylu posiadających grupę karboksylową; cztery z nich nie były dotąd znane. W rozdziale **3.1.4** przedstawiona jest natomiast synteza pochodnych urydyny. Opisana tu metodologia nie budzi zastrzeżeń z jednym wyjątkiem. Związek **43** (str. 89) jest racematem, zatem w reakcji łączenia z optycznie czynnym fragmentem (czyli otrzymanym wcześniej amino-tio-glikozydem; np. **33**) będą powstawać dwa diastereoizomery. Czy związki **66**, **67** i **110** na str. 105 to rzeczywiście mieszanina?

Otrzymane pochodne uracylu oraz urydyny poddano sprzęganiu z odpowiednimi amino-tio-glikozydami otrzymując oczekiwane związki docelowe. Aby poddać je badaniom biologicznym należało usunąć grupy blokujące. O ile deprotekcja grup estrowych (octany) i acetalowych (izopropyliden) nie nastręczała trudności, o tyle usunięcie grup benzylowych w obecności ugrupowania tio-glikozydowego było sporym wyzwaniem. Kwas Lewisa taki jak BCl_3 pozostawiał nienaruszone niektóre bloki (np. schemat 60; str. 108); dopiero zastosowanie bezwodnego $FeCl_3$ rozwiązało problem w sposób zadowalający dając oczekiwane produkty z bardzo dobrymi wydajnościami (Tabela 23; str. 111).

Rozdział **3.5** opisuje badania aktywności biologicznej otrzymanych przez doktoranta glikokoniugatów względem β-1,4-galaktozylotransferazy. Jak pisze doktorant „*wybór tego enzymu był podyktowany niską ceną oraz prostotą w wykonaniu badań.*" Nie jestem przekonany czy to uzasadnienie jest właściwe. Bardziej przemawiałoby do mnie stwierdzenie, że otrzymane przez mgr. Romana Komora glikokoniugaty, ze względu na podobieństwo do istniejących inhibitorów lub też ze względu na ewentualne powinowactwo do tego konkretnego enzymu mogą być aktywne. Doktorant dokładnie opisuje metodykę tych badań, w tym również test cytotoksyczności MTT. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że wbrew oczekiwaniom najbardziej aktywne były pochodne D-glukozy a nie D-galaktozy. Bardziej aktywne były anomery β, mimo iż naturalny substrat posiada konfigurację α na centrum anomerycznym.

Część eksperymentalna jest napisana dość zwięźle i przejrzyście. Brakuje mi oznaczeń analizy elementarnej; tylko dla finalnych glikokoniugatów podane są wartości HRMS. Wszystkie inne związki są scharakteryzowane za pomocą LRMS. W niektórych miejscach znalazłem duże rozbieżności pomiędzy danymi uzyskanymi przez doktoranta a literaturowymi. Np. (str. 135) zmierzona przez mgr. Komora wartość $[\alpha]_D$ dla związku **24** wynosi +65.8 a wg lit.[199] + 93.6 choć pomiary były robione w identycznych warunkach (c ~1 $CHCl_3$). Podane przez doktoranta wartości $[\alpha]_D$ wielu związków wahają się od 0.0 do 0.2 (c 0.5, $CHCl_3$); dotyczy to przykładowo (str. 156 i dalsze) związków: **57**, **59**, **60** (tu jest 0.0!), **61**, **63**, **65** itd. Wydaje mi się, że podawanie tak niewielkich wartości miałoby sens tylko dla stężeń znacząco większych niż c = 0.5. Dla związków **25** i **26** wartości $[\alpha]_D$ podane są (nieprawidłowo) w stopniach (str. 136).

Inne drobne uwagi krytyczne i/lub polemiczne.

- Str. 9: Co to jest 'naturalny substrat enzymu'?
- Str. 10: Co to znaczy, że wiązania glikozydowe muszą być tworzone ***stereospecyficznie***. Chyba chodzi o 100% stereoselektywność? 100% selektywność to nie jest to samo co stereospecyficzność!!
- Str. 12: Sformułowanie 'atom węgla anomerycznego" powinno być zmienione na: anomeryczny atom węgla.
- Str. 19: Sformułowanie 'możliwość stereokontrolowania reakcji" jest określeniem żargonowym. Powinno brzmieć: 'możliwość kontroli sterycznej'.
- Dlaczego odnośnik charakteryzujący właściwości tri-*O*-benzylo-1,6-anhydro-glukozy (**21**) pochodzi z roku 2010 (ref. [97]: *TL.*, **2010**, *51*, 5912) choć związek jest znany i opisany już kilkadziesiąt lat wcześniej.
- Str. 125: co oznacza: „niekompetycyjnie badany enzym"?
- Str. 126: Czy w języku polskim istnieje słowo '*fluorescent*'? (TLC .... [wykonano]... na fazie stacjonarnej w postaci płytek aluminiowych pokrytych cienką warstwą żelu krzemionkowego z dodatkiem fluorescenta).

Praca pisana jest BEZOSOBOWO (postanowiono, zrobiono, dokonano itd.). O ile w części literaturowej brzmi to właściwie to w części badania może własne sugerować, że nie jest to własna praca doktoranta, które to stwierdzenie jest – oczywiście – nieprawdziwe.

Podsumowując należy stwierdzić, że główny cel pracy doktorskiej mgr. Romana Komora: synteza glikokoniugatów – analogów naturalnego substratu β-1,4-galaktozylotransferazy – UDP-galaktozy

został zrealizowany pomyślnie. Doktorant zaproponował dogodną syntezę połączeń zawierających w swojej strukturze część cukrową, linker i nukleozyd lub część go imitującą – acykliczną pochodną nukleozydu. Wobec trudności w powtórzeniu niektórych przepisów literaturowych (np. w syntezie tio-cukrów działaniem odczynnika Lawesson'a) doktorant usprawniał z powodzeniem inne metody syntezy. Zaproponował np. procedurę typu *one-pot* otrzymywania 1-tio-cukrów polegającą na przekształceniu benzylowanych pochodnych cukrów redukujących w *N*-metylo-*O*-glikozylotiokarbaminiany i następczym ich przegrupowaniu. Przeprowadzony 'screening' właściwości biologicznych wykazał, że glikokoniugaty, w których 1-tioglikozydy połączone są z acyklicznymi pochodnymi uracylu są aktywniejsze od ich analogów połączonych z urydyną.

Mimo wskazanych uprzednio uwag polemicznych, pracę mgr. Romana Komora oceniam pozytywnie. Osiągnął ona wiele wartościowych wyników poszerzających naszą wiedzę w chemii cukrów i glikokoniugatów. Podsumowując stwierdzam, że doktorant wykazał się dużą pracowitością, inwencją naukową i dociekliwością. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie warunki ustawy i wnoszę o dopuszczenie magistra inż. Romana Komora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.