

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
dr hab. n. farm. Iwona Elżbieta Głowacka

Łódź 27 czerwca 2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Marii Kasperowicz-Frankowskiej
p.t. „Zastosowanie pochodnych proliny do syntezy predykcyjnych
enantjomeroróżnicujących odczynników kondensujących dostępnych w obydwu formach
enantjomerycznych”

przedstawiona Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej w celu uzyskania
stopnia doktora nauk chemicznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Zbigniewa J. Kamińskiego, którego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół poszukiwań nowych odczynników kondensujących w syntezie peptydów i białek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ powszechnie przyjęty dla prac doktorskich i jest podzielona na sześć rozdziałów: *Cel i założenia projektu*, *Część referatowa*, *Badania własne*, *Część Eksperymentalna*, *Streszczenie* i *Literatura cytowana*. Praca jest poprzedzona wykazem skrótów użytych przez Autorkę.

Przedstawiając *Cel i założenia projektu* mgr Katarzyna Kasperowicz-Frankowska wyjaśnia, jak ważnym zadaniem jest rozwiązanie problemu dostępu do optycznie czynnych reszt aminokwasowych. Opisuje budowę oraz mechanizm działania odczynników predykcyjnych. Klarownie definiuje cel pracy obejmujący poszukiwania nowych chiralnych amin trzeciorzędowych pochodnych proliny, które w reakcji z 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,2,3-triazyną albo 2,4-dichloro-6-metoksy-1,2,3-triazyną tworzyłyby czwartorzędowe sole N-triazynyloamoniowe mogące spełniać rolę chiralnego modułu triazynowego predykcyjnych odczynników kondensujących.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Pozyskanie obu form enancjomerycznych takiego odczynnika daje możliwość, przy zastosowaniu racemicznego substratu, wbudowywania w łańcuch peptydowy dowolnego z enancjomerów aminokwasów kodowanych jak i niekodowanych w sposób zapewniający oczekiwaną konfigurację oraz oczekiwane wzbogacenie enancjomeryczne.

Część referatowa zawiera przegląd metod syntezy oraz zastosowań pochodnych proliny zawierających trzeciorzędowy atom azotu. Rozdział ten stanowi doskonałe wprowadzenie w podjęty wątek badawczy. Doktorantka przedstawiła krótką charakterystykę proliny jako aminokwasu białkowego, a następnie opisała metody N-alkilowania oraz zastosowanie pochodnych N-alkilowych, N-alkenyłowych i N-alkinyłowych proliny w syntezie związków biologicznie aktywnych. Kolejny podrozdział dotyczy przeglądu bicyklicznych pochodnych proliny, w którym mgr Kasperowicz-Frankowska opisuje metody syntezy układów spirocyklicznych N-alkiloproliny oraz pierścieni oksazolidynowych i oksazolidynonowych, jak również ich wykorzystanie w syntezie organicznej. Ta część pracy jest obszernym (55 stron) opracowaniem obejmującym 144 pozycje literaturowe. Duża liczba i różnorodność opisanych struktur zasługują na uznanie, jednak lekturę tej części pracy utrudniają drobne, choć dość liczne usterki/omyłki, m.in. dotyczące numeracji związków i tak np.,:

- na stronie 29 ester allilowy (*S*)-*N*-alliloproliny ma numer **93b**, a stroną dalej (str. 30) ten sam związek jako mieszanina racemiczna ma numer **110b**, zaś na stronie 81 – **337c**;
- aldehyd benzoesowy to związek **252** na stronie 49, na 65 – **315b**, zaś na 68 – **253**;
- miejscami w tekście brak odwołań do poszczególnych tabel/rysunków/schematów; np. str. 44 do tabeli 5; str. 47 do rysunku 18; strona 50 do schematu 43;
- skrótem DIPEA określa się diizopropylodetyloaminę, a nie diizopropylaminę – wykaz skrótów str. 8 i część referatowa str. 42.

W rozdziale „*Badania własne*”, stanowiącym najważniejszą część recenzowanej pracy, Autorka skrupulatnie opisuje poszczególne etapy zmierzające do pozyskania w obu formach enancjomerycznych predykcyjnych enancjoróżnicujących odczynników kondensujących wywodzących się z proliny. Rozdział ten poprzedzony jest krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorantka przedstawia modułową budowę predykcyjnych triazynowych odczynników kondensujących zaprojektowanych w zespole Promotora. Porównuje działanie klasycznego chiralnego odczynnika kondensującego i predykcyjnych enancjoróżnicujących odczynników kondensujących, przedstawiając zalety tych ostatnich. Ponadto w zwięzły i przekonujący sposób wyjaśnia wybór proliny jako najbardziej efektywnego induktora chiralności wśród aminokwasów naturalnych.



Swoje badania Doktorantka rozpoczęła od syntezy biblioteki estrów (metylowego, propylowego i allilowego) *N*-metylo- i *N*-alliloproliny oraz amidów *N*-metyloproliny. Udowodniła, że w procesie *N*-allilowania estrów alkilowych proliny jako produkt uboczny tworzy się pochodna posiadająca dodatkowe ugrupowanie allilowe w pozycji alfa pierścienia proliny, co wskazuje na możliwość tworzenia w warunkach reakcji anionu enolanowego i związanej z tym racemizacji. Szkoda, że w celu pełniej charakterystyki otrzymanych związków nie ustalono stopnia racemizacji, ani też nie udowodniono, że są to mieszaniny racemiczne. Pomimo to Doktorantka zdecydowała się wykorzystać estry *N*-alliloproliny jako chiralne komponenty aminowe we wstępnych badaniach kondensacji z użyciem odczynników triazynowych. Podjęła próby sprawdzenia ich aktywności w syntezie soli *N*-triazynyloamoniowych wywodzących się z 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,2,3-triazyny (CDMT) oraz 2,4-dichloro-6-metoksy-1,2,3-triazyny (DCMT), a następnie wykorzystania ich jako chiralnych modułów wchodzących w skład odczynników triazynowych w modelowej reakcji kondensacji *p*-toluidyny z kwasem *p*-metoksybenzoesowym. Doktorantka wykazała, że pochodne *N*-alkiloprolin ulegają czwartorzędowaniu tworząc odpowiednie chiralne sole *N*-triazynyloamoniowe, jednak reakcje kondensacji pomiędzy kwasami i aminami z ich udziałem przebiegają bardzo wolno. Aby upewnić się, że estry *N*-alliloproliny spełniają podstawowe wymagania oczekiwane od chiralnego modułu enancjoróżnicującego przeprowadziła serie eksperymentów polegających na zastosowaniu odczynnika generowanego *in situ* z DCMT do aktywacji grupy karboksylowej w *rac*-Z-Ala-OH i następnie sprzęgania z estrem metylowym glicyny. Udowodniła, że estry *N*-alliloproliny mogą być zastosowane w triazynowych odczynnikach enancjoróżnicujących, ale dipeptydy tworzą się z niskimi wydajnościami i niewielkimi nadmiarami enancjomerycznymi. Doktorantka słusznie powiązała tę obserwację z zawadą przestrzenną na atomie azotu i dlatego w dalszych badaniach mgr Kasperowicz-Frankowska skoncentrowała się na poszukiwaniu chiralnych komponentów odczynników predykcyjnych wśród bicyklicznych pochodnych proliny zawierających przyczółkowy atom azotu. Najpierw takie układy bicykliczne Doktorantka zamierzała otrzymać z proliny konstruując pierścień oksazolidynonowy. Wykorzystała do tego celu reakcje proliny z wodianem chloralu i aldehydem benzoesowym, a także acetalami dimetylowymi benzaldehydu i 3,4-dimetoksybenzaldehydu. Wykazała, że tylko pochodna otrzymana w reakcji proliny z chlorałem spełnia wymogi oczekiwane od predykcyjnego odczynnika kondensującego, jednakże i w tym przypadku reakcje przebiegały bardzo wolno (ok. 48 h). Analizując dotychczasowe wyniki mgr Kasperowicz-Frankowska powiązała niską reaktywność oksazolidynonów pochodnych proliny z obecnością grupy karbonylowej w pierścieniu, która poprzez efekt indukcyjny powoduje obniżenie gęstości elektronowej na atomie azotu. Dlatego też konsekwentnie realizując założenia projektu mgr Kasperowicz-Frankowska zwróciła uwagę na możliwość wykorzystania oksazolidyn otrzymanych z prolinolu albo z difenyloprolinolu. Jednoznacznie wykazała, że pochodne

prolinolu nie ulegały reakcji czwartorzędowania z CDMT, natomiast pochodne wywodzące się z difenylprolinolu tworzyły nietrwałe chlorki N-triazynyloamoniowe, a próby ich przekształcenia w trwałe sole N-triazynyloamoniowe zakończyły się niepowodzeniem. Jako sposób rozwiązania tego problemu Doktorantka zaproponowała generowanie odpowiednich odczynników *in situ*. Jako modelowy dipeptyd mgr Kasperowicz-Frankowska wybrała Z-Ala-Gly-OMe. Po zoptymalizowaniu warunków syntezy (rodzaj rozpuszczalnika, ilość użytej DIPEA, wpływ temperatury) chromatograficznie oznaczyła stopień wzbogacenia enancjomerycznego otrzymanych dipeptydów wykazując, że możliwe jest zsyntetyzowanie tą metodą związków niemalże enancjomerycznie czystych (99,8%). Uogólniając swoje obserwacje Doktorantka stwierdziła, że użycie odczynnika predykcyjnego otrzymanego z difenylprolinolu o konfiguracji *S* prowadzi do utworzenia enancjomeru aminokwasu o konfiguracji *L*, podczas gdy użycie jako odczynnika pochodnej o konfiguracji *R* preferuje tworzenie aminokwasów o konfiguracji *D*. Na podkreślenie zasługuje tutaj fakt, że w przypadku zastosowania bicyklicznej pochodnej difenylprolinolu obserwowano zarówno w przypadku aminokwasów alifatycznych, jak i zawierających ugrupowania aromatyczne, zachowanie relacji stereochemicznych pomiędzy fragmentem indukującym i tworzącym się aminokwasem. Do tej pory w przypadku predykcyjnych odczynników triazynowych opracowanych w zespole prof. Kamińskiego opartych na alkaloidach z chiralnym przycółkowym atomem azotu preferencje były odmienne dla aminokwasów alifatycznych i zawierających ugrupowania aromatyczne. Ukoronowaniem pracy byłoby zaproponowanie przez Doktorantkę modelu stanu przejściowego reakcji, w której odbywa się rozdział kinetyczny analizujący oddziaływania steryczne pochodnej prolinolu i wybranego aminokwasu.

Mgr Katarzyna Kasperowicz-Frankowska uznała, że dotychczasowe osiągnięcia należy wykorzystać w syntezie peptydów na nośnikach polimerowych. Jako obiekt badań wybrała fragment 23-27 ludzkiej amyliny (o sekwencji H-PheGlyAlaIleLeu-OH) będący rdzeniem amyloidального hormonu zakładając, że wbudowanie w miejsca *N*- i *C*-terminalnych reszt aminokwasów wywodzących się z nienaturalnych aminokwasów: β^2 -hPhe-OH i β^2 -hLeu-OH pozwoli na uzyskanie analogów natywnego fragmentu 23-27 amyliny odpornych na działanie egzopeptydaz. Najpierw zrealizowała syntezę peptydu H- β^2 -hPheGlyAlaIleLeu-OH wykorzystując żywicę 2-chlorotrylową, w której końcowy etap obejmował modyfikację procedury polegającą na enancjoselektywnym acylowaniu funkcji aminowej przy użyciu jako nośnika chiralności generowanych *in situ* soli N-triazynyloamoniowych wywodzących się zarówno z (*S*)- jak i (*R*)-difenylprolinolu. Dodatkowo, mgr Kasperowicz-Frankowska potwierdziła, że również w syntezach na nośnikach polimerowych zachowane są wcześniej ustalone relacje stereochemiczne pomiędzy konfiguracjami induktora chiralności a tworzącymi się w nadmiarze aminokwasami. Aby zrealizować modyfikację fragmentu 23-27 amyliny na C-końcu polegającą na wprowadzeniu (*S*)- albo (*R*)- β^2 -hLeu Doktorantka wykorzystwała żywicę Wanga jako nośnik polimerowy.

Z sukcesem rozwiązała wszystkie problemy syntetyczne i stereochemiczne, które pojawiły się w tej części projektu.

Rozdział badania własne kończy *Podsumowanie*, w którym Doktorantka w zwięzłe przypomina cel pracy, a następnie opisuje jej wyniki, choć powtórzenia treści zawarte w tym rozdziale doprowadziły recenzenta do wniosku, że zapewne omyłkowo, dołączone zostało do niego streszczenie znajdujące się jako osobny rozdział na stronie 194.

Należy podkreślić determinację mgr Kasperowicz-Frankowskiej, która konsekwentnie, pomimo wielu negatywnych wyników, zrealizowała założony cel badawczy. Ponadto na uznanie zasługuje szeroki zakres wykonanych prac badawczych, które Doktorantka zaplanowała w sposób w pełni przemyślany, a w trakcie ich realizacji wykazała się biegłością w posługiwaniu się najnowszymi metodami syntezy peptydów, analizowaniu wyników oraz wyciąganiu wniosków.

Również i w tej części pracy Doktorantce nie udało się uniknąć drobnych pomyłek językowych oraz w głównej mierze pomyłek dotyczących numeracji związków, o których wspominam z obowiązku recenzenta, i tak przykładowo:

- str. 73 tabela 13 punkt 2 wzór **335b** przedstawia alkohol izobutyłowy a powinien być izopropylowy;
- str. 75 i 95 w warunkach reakcji pojawia się zwrot „refluks”;
- str. 79 rysunek 30a widmo ^1H NMR nie koreluje z opisem widma w części eksperymentalnej (przeskalowane o ca. 0,65 ppm);
- str. 87 i str. 90 błędy w numeracji związków na schematach 71 i 73.

Część eksperymentalna zawiera szczegółowe opisy procedur, stosowanej aparatury (choć nie wymieniono nazwy/producenta polarymetru) oraz wyników pomiarów z zastosowaniem metod analitycznych odpowiednich w uprawianej tematyce, w tym spektroskopowych (czas retencji, wydajność, NMR, IR, MS). Analizę tej części pracy z pewnością ułatwiłoby wyłączenie z niej eksperymentów „nieudanych”, których pominięcie nie obniżyłoby w żadnej mierze wartości merytorycznej rozprawy.

Analiza strukturalna otrzymanych związków nie budzi zastrzeżeń, choć można by oczekiwać większej dokładności w opisie widm NMR. Trudno chociażby uwierzyć, że nie było możliwe odczytanie stałych sprzężenia dla dwóch dubletów pochodzących od grup metylowych reszty izopropylowej w związku **335b** (ester izopropylowy proliny), a takich sygnałów należy oczekiwać zamiast multipletu w zakresie 1,26–1,37 ppm opisanego przez Doktorantkę (str. 129).



Literatura cytowana w przedstawionej rozprawie doktorskiej obejmuje 202 pozycje, wśród których jest kilka błędów: np. w pozycjach 61 i 158 cytowana jest ta sama praca (czasopismo, rok, wolumin i strony), ale inni autorzy i tytuł artykułu; pozycje 55 i 160 – dotyczą tej samej publikacji.

Podsumowując, uważam, że założony cel pracy został w pełni zrealizowany. Uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań zostały opublikowane w postaci 3 artykułów w czasopiśmie z tak zwanej „*listy filadelfijskiej*”.

Uwagi zawarte recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają merytorycznej strony dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała się dużą determinacją oraz kreatywnością w planowaniu zadań i rozwiązywaniu problemów badawczych. Przeprowadzono ogrom prac syntetycznych i analitycznych na światowym poziomie, spełniających warunek oryginalności prowadzonych badań.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Marii Kasperowicz-Frankowskiej spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. z 2003r. Nr 65, poz. 595). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

