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

Łódź, 14 kwietnia 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Tracz
p.t. „Węglowodany w syntezie oryginalnych bloków budulcowych”
przedstawiona Radzie ds. Stopni Naukowych Wydziału Chemii Uniwersytetu
Łódzkiego w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem dr hab. Anny Zawiszy, prof. UŁ. Badania przeprowadzone przez mgr Aleksandrę Tracz są częścią szeroko zakrojonych prac prowadzonych w zespole Pani Promotor, dotyczących zarówno chemii węglowodanów jak i syntezy chiralnych azirydyn oraz wykorzystania ich aktywności katalitycznej w syntezie asymetrycznej.

Rozprawa ma układ powszechnie przyjęty dla prac eksperymentalnych i została przygotowana w formie 169-stronicowej dysertacji, zawierającej wykaz stosowanych skrótów, streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wstęp, część literaturową, omówienie wyników badań własnych, podsumowanie, część eksperymentalną, literaturę cytowaną oraz 2-stronicowy suplement zawierający listę publikacji, konferencji i projektów naukowych współautorstwa Doktorantki.

Dysertację rozpoczyna wykaz stosowanych w pracy skrótów oraz streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, które jest kwintesencją prowadzonych badań. W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wstęp” Doktorantka wprowadza Czytelnika w realizowaną tematykę wykazując jej aktualność potwierdzoną danymi literaturowymi, jak również nakreśla cele badawcze. Dowiadujemy się, że w ramach przedstawionej rozprawy celem zaprojektowanych przez Doktorantkę badań było opracowanie metod syntezy nowych pochodnych C-glikozylo-aminoetylosiarczkowych o konfiguracji D-gluko i D-galako, jak również węglowodanowych pochodnych Lakozamidu - leku przeciwpadaczkowego najnowszej generacji. W syntezie obu klas związków, oprócz węglowodanów wykorzystano chiralne azirydyny, które poddane reakcji nukleofilowego otwarcia pierścienia prowadziły do oczekiwanych połączeń.

Następnie Autorka przygotowała obszernie 55-stronicowe opracowanie poświęcone przeglądowi literaturowemu, w którym na początku opisuje stan wiedzy dotyczący właściwości farmakologicznych oraz znanych metod syntezy Lakozamidu oraz jego pochodnych, uwzględniając wpływ podstawników zarówno w części arylovej, jak również alkoksylovej, a następnie koncentruje się na przeglądzie reakcji nukleofilowego otwarcia pierścienia azirydynowego. Rozdział ten doskonale koreluje z podjętą tematyką badawczą, a jednocześnie potwierdza, że Doktorantka potrafi pozyskiwać niezbędne informacje i krytycznie analizować wcześniejsze prace. Ta część pracy napisana jest poprawnym językiem niebudzącym zastrzeżeń. Nie udało się jednak Autorce uniknąć drobnych pomyłek czy błędów edytorskich: tytuł rozdziału

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

2.4.3. i 2.4.4 oraz podpis schematu 2.3 zamiast Lakozamid jest Lakozmid; brak konsekwencji w wypowiedzi, jak czytamy na str. 14 „Zaproponowana przez Yanga ścieżka syntezy (R)-Lakozamidu (Schemat 2.2), rozwiązała problemy z częściową racemizacją, która miała miejsce na etapie metylowania,” a dalej w tym samym podrozdziale w podsumowaniu zalet i wad opracowanej metody Doktorantka stwierdza „Do nieuniknionych wad tej metody można zaliczyć jedynie częściową racemizację w trakcie metylowania”; str. 17: „Biorąc pod uwagę budowę estrów **2.8** i **2.11**,” podczas gdy związek **2.11** jest amidem.

Wyniki przeprowadzonych prac eksperymentalnych i ich omówienie Autorka opisała na kolejnych 21 stronach w rozdziale „Omówienie wyników badań własnych”, który stanowi integralną część recenzowanej pracy i został podzielony zgodnie z założonymi celami na dwa podrozdziały: „Synteza pochodnych C-glikozylo-aminoetylosiarczkowych” i „Synteza cukrowych pochodnych Lakozamidu”. Każdy podrozdział zawiera wprowadzenie związane z koncepcją i zaprojektowaniem przeprowadzonych badań. Punktem wyjścia do podjętych badań były tu niewątpliwie wcześniejsze dokonania i osiągnięcia zespołu Pani Promotor.

W pierwszej części Autorka opisuje opracowaną prostą i stereoselektywną metodę syntezy zaprojektowanych pochodnych C-glikozylo-aminoetylosiarczkowych, różniących się konfiguracją podstawników w części cukrowej. Prace badawcze mgr Tracz rozpoczęła od syntezy pochodnych D-gluko- i D-galaktoglikali (związki **3.16**, **3.17**), które otrzymała w zaplanowanych sekwencjach reakcji, wykorzystując jako substraty handlowo dostępne tri-O-acetylo-D-gluko- i tri-O-acetylo-D-galaktoglikałe. Drugim komponentem niezbędnym w zaplanowanej syntezie były odpowiednie enancjomerycznie czyste azirydyny (związki **3.13** i **3.15**), które Autorka otrzymała z L-seryny wykorzystując opisane w literaturze przekształcenia. Następnie krok po kroku Autorka opisuje poszczególne podejścia prowadzące do otrzymania azirydynowych pochodnych C-glikozydów. Należy zwrócić uwagę, że w toku prowadzonych badań mgr Tracz zbadała stereochemię reakcji addycji związku metaloorganicznego do grupy karbonylowej optycznie czystego 1-trifenylo-metyloazirydino-2-karboaldehydu (**3.15**), jak również określiła wpływ kationu metalu na stereoselektywność prowadzonej reakcji (model Felkina-Anha vs chelatowanie). Autorka wykazała znikomy wpływ chelatacji; w przypadku pochodnych galaktalu reakcje przebiegają głównie zgodnie z modelem Felkina-Anha (w przewodzie powstaje izomer *treo*), natomiast w przypadku pochodnej glukalu większy udział jest „kontrolowanego przez chelatację” tworzenia wiązań węgiel-węgiel (wzrost ilości izomeru *erythro*) jednak nie przekracza on 50%. Posiłkując się doniesieniami literaturowymi konfiguracje absolutne powstałych diastereoizomerycznych alkoholi Autorka określiła za pomocą spektroskopii ^1H NMR. Finalne pochodne C-glikozylo-aminoetylosiarczkowe mgr Tracz otrzymała w sekwencji reakcji obejmującej deprotekcję grup ochronnych w pierścieniu cukrowym, a następnie otwarcie pierścienia azirydynowego tiofenolem. Struktury otrzymanych C-glikozylo-aminoetylosiarczków Autorka ustaliła interpretując widma ^1H -, ^{13}C NMR, DEPT, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, a także wyniki spektrometrii mas. Świadczy to bardzo dobrze o technice pracy Doktorantki i jej doskonałym przygotowaniu warsztatowym. Potwierdzone zostały również umiejętności posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi do określania budowy otrzymanych związków.

W kolejnej części Autorka na wstępie uzasadnia celowość założonej modyfikacji struktury Lakozamidu, która polega na wprowadzeniu fragmentu cukrowego w miejsce ugrupowania benzyloвого. W planowaniu syntez widać dojrzałość naukową mgr Aleksandry Tracz, która przeprowadziła analizę ryzyka niepowodzenia projektu. Zaproponowała dwie niezależne ścieżki syntetyczne węglowodanowych pochodnych Lakozamidu: kondensację pochodnych

aminoglukozy z kwasem (*S*)-2-acetamido-3-metoksypropanowym i alternatywną metodę obejmującą kondensację pochodnych aminoglukozy z kwasem azirydynokarboksylovym, a następnie otwarcie pierścienia azirydynowego w otrzymanym amidzie wybranymi nukleofilami. Skrupulatnie realizując cele badawcze pracę nad tą częścią projektu mgr Tracz rozpoczęła zgodnie z założeniami od przeprowadzenia reakcji kondensacji 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu metylu i 3,4,6-tri-*O*-benzylo-2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu benzylu z kwasem (*S*)-2-acetamido-3-metoksypropanowym. Jednakże pomimo zastosowania różnych warunków i odczynników sprzęgających, w tym DMTMM, NMM/IBCF i EDC/HOBt nie uzyskała zaplanowanych pochodnych. Konsekwentnie dążąc do zrealizowania postawionego celu otrzymane aminoglukopiranozydy mgr Tracz poddała reakcji z 1-trifenylometylo(azirydyn-2-ylo)karboksylanem metylu, jednakże i w tym przypadku spotkała się z niepowodzeniem na etapie tworzenia wiązania amidowego. Dlatego też po dogłębnej analizie literatury przeprowadziła reakcje kondensacji pochodnych aminoglukozy z kwasami *N*-trityloazirydno-2-karboksylovym (**3.36**) i *N*-tosyloazirydno-2-karboksylovym (**3.39**), stosując jako odczynnik sprzęgający EDC/HOBt. W obu przypadkach mgr Tracz otrzymała z zadowalającymi wydajnościami zaplanowane pochodne różniące się zarówno fragmentem cukrowym jak i azirydynowym, które w kolejnych etapach poddała reakcjom otwarcia pierścienia azirydynowego za pomocą wybranych nukleofilu siarkowych (tiofenol, naftaleno-2-tiol) oraz tlenowych (metanol, metanolan sodu). Struktury otrzymanych związków ustaliła na podstawie analizy widm ^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT, ^1H - ^1H COSY oraz ^1H - ^{13}C HMQC. Z uwagi na przemyślany wybór podstawników na atomie azotu w pierścieniu azirydynowym kwasów azirydno-2-karboksylovych (podstawnik tosylovu, aktywuje pierścień azirydny w reakcjach z nukleofilami, podczas gdy podstawnik tritylovu jest podstawnikiem nieaktywującym), jak również grup ochronnych w części węglowodanowej, Autorka dokonała analizy wpływu tych fragmentów na regiochemię i wydajność reakcji. Zbadala również wpływ temperatury, czasu reakcji oraz budowy nukleofila na regiochemię reakcji otwarcia pierścienia azirydynowego. Jedynie reakcje *O*-benzylovych pochodnych, zarówno z nukleofilami siarkowymi jak i tlenowymi okazały się w pełni regioselektywne. Ponadto Doktorantka wykazała, że amidy zawierające na atomie azotu w pierścieniu azirydynowym ugrupowanie tritylowe łatwiej ulegają reakcjom otwarcia pierścienia w obecności nukleofilu siarkowych niż pochodne *N*-tosylove, natomiast w przypadku nukleofilu tlenowych Autorka zaobserwowała odwrotną zależność.

Mgr Aleksandra Tracz wykazała się umiejętnością wykorzystywania doświadczeń i wyników wcześniejszych prac prowadzonych w macierzystym zespole, jak również studiowania literatury przedmiotu. Należy podkreślić, że Doktorantka opracowała prostą regio- i stereoselektywną metodę syntezy pochodnych *C*-glikozylo-aminoetylosiarczkowych oraz wydajną metodę syntezy węglowodanowych pochodnych Lakozamidu.

Opisane wyniki prac wskazują na logiczny tok rozumowania i świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Należy podkreślić, że ustalając budowę chemiczną nowo zsyntetyzowanych połączeń wykazała się Ona biegłością w interpretacji widm NMR i w wykorzystywaniu danych spektralnych w analizie strukturalnej.

Ta część pracy napisana jest poprawnym językiem, niebudzącym zastrzeżeń. Niemniej jednak nie udało się Autorce uniknąć kilku pomyłek/niejasności oraz błędów edytorskich, o których wspominam z obowiązku recenzenta:

Str.31 Autorka pisze: „Ponadto należy zauważyć, że (S)-Lakozamid w porównaniu do stosowanego w terapii przeciwdrgawkowej (R)-Lakozamidu, wykazywał znacznie niższą aktywność. Jego współczynnik ED_{50} wynosił 8,4 mg/kg dla myszy, natomiast w teście przeprowadzonym na szczurach posiadał identyczną wartość jak dla (R)-Lakozamidu.” Nasuwa się zatem pytanie, dlaczego w pracy podjęto próby syntezy węglowodanowych pochodnych (S)-Lakozamidu, a nie izomeru (R)?

Str. 87 Nazwa związku o numerze 3.45 w tytule rozdziału 3.2.1.5., w tytule schematu 3.16, jak również w części eksperymentalnej brzmi 2-amino-2-deoksy-1,3,4,6-tetra-*O*-benzylo- β -D-glukopiranoza, podczas gdy jest to glukopiranozyd.

W Podsumowaniu pracy badawczej Autorka przedstawiła zrealizowane cele. Należy podkreślić szeroki zakres wykonanych prac badawczych, które Doktorantka zaplanowała i zrealizowała, jak również biegłość w analizowaniu wyników oraz wyciąganiu wniosków.

Część eksperymentalna rozprawy to 41-stronicowe opracowanie, w którym Doktoranta w staranny i przejrzysty sposób przedstawiła szczegółowy opis procedur wykorzystanych do syntezy nowych związków wraz z ich pełną charakterystyką. Analiza strukturalna otrzymanych związków nie budzi zastrzeżeń, natomiast nieprawidłowo została określona konfiguracja absolutna na atomie węgla C2 w części kwasowej, w związkach o numerach 3.62A, 3.62B oraz 3.64B.

Literatura cytowana (196 pozycji) w przedstawionej rozprawie doktorskiej prezentowana jest zarówno w formie przypisów dolnych, jak również stanowi osobny rozdział, co oceniam jako dobre rozwiązanie ułatwiające analizę tekstu.

W mojej opinii przedstawiona do oceny praca wnosi istotne wartości naukowe do badań nad doskonaleniem stereokontrolowanej syntezy związków organicznych. Wyniki badań są cenne i stanowią pewnego rodzaju drogowskaz do poszukiwania i syntezy kolejnych połączeń w tej klasie pochodnych.

Pragnę również podkreślić, że uwagi zawarte recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, którą oceniam wysoko. Założony cel pracy został w pełni zrealizowany. Uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań zostały opublikowane w postaci 1 artykułu w czasopiśmie „Molecules” (IF=4,927; 140 pkt. MNiSW). W swoim dorobku Doktorantka posiada również 11 komunikatów zaprezentowanych na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Jest także współautorką 1 publikacji naukowej niezwiązanej z tematyką rozprawy doktorskiej. Ponadto jako wykonawca brała udział w realizacji 2 projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Tracz spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tj. Dz. U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady ds. Stopni Naukowych Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Iwona Glowacka

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