



Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Łódź, 22 maja 2023

Dr hab. inż. Grażyna Leszczyńska, prof. Uczelni

Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny

90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116

Tel. +48 313150

grazyna.leszczynska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Liwii Lebelt pt. „Fosfonianowe analogi kwasów amino(hidroksy)karboksylowych o potencjalnej aktywności biologicznej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr inż. Liwii Lebelt została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Doroty Piotrowskiej, w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W kategoriach ogólnych, celem projektu doktorskiego było opracowanie syntezy fosfonowych analogów kwasu glutaminowego, które w założeniu miały wykazywać selekcję względem glutaminergicznych receptorów metabotropowych. Ten rodzaj aktywności biologicznej związków chemicznych determinuje ich dalszy skrining w kierunku poszukiwania leków skutecznych w leczeniu depresji, epilepsji oraz chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne. Wszystkie wymienione choroby generują trudności w zakresie aktywności dnia codziennego; część jest nieuleczalna; depresja jest najczęstszą chorobą psychiczną na świecie. To powoduje, że prace nad skutecznym leczeniem tych chorób stanowią jedno z wyzwań współczesnej chemii medycznej. Stąd można śmiało powiedzieć, że recenzowany projekt doktorski w swoich założeniach doskonale wpisuje się w te niezwykle ważne i aktualne trendy badawcze.

Praca doktorska mgr Lebelt została przygotowana w formie tradycyjnej. Na liczący 146 stron dokument składają się: *Wstęp* wykazujący celowość podjętych przez doktorantkę prac badawczych; *Część literaturowa*; *Omówienie wyników badań*; *Podsumowanie*, *Wnioski*, *Część eksperymentalna*, *Literatura cytowana* licząca 173 odnośniki oraz *Streszczenie*.

Wymienione części pracy doktorskiej uzupełnia wykaz skrótów oraz całkowity dorobek naukowy Doktorantki. Praca jest napisana językiem fachowym, praktycznie bez błędów literowych, oprawa graficzna pracy jest estetyczna i zdecydowanie ułatwia śledzenie opisywanych treści. Niektóre związki posiadają podwójną numerację, np. związek 26 i 29 na str. 15 (Schemat 1), w części *Omówienie wyników badań* przyjął numer odpowiednio, 163 i 164 (Schemat 24). Zdarzają się błędy typu „kopiuj-wklej”, np. identyczna nazwa związków 161 i 162 na str. 55.

Podstawę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Lebelt stanowią trzy artykuły, które zostały opublikowane w czasopismach *Molecules*, *Umedical Reports* oraz *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. Artykuły zostały opublikowane w latach 2019-2022. W dwóch publikacjach, Pani Lebelt jest pierwszym autorem, co pozwala sądzić, że rola Doktorantki w planowaniu i wykonywaniu badań była wiodąca.

Ponadto, Doktorantka jest współautorką 5 innych publikacji oraz 4 komunikatów konferencyjnych. Była również wykonawcą projektu OPUS 9, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Przechodząc do recenzji samej pracy doktorskiej, w pierwszej kolejności skoncentruję się na rozdziale *Przegląd literaturowy*. Jest on napisany w sposób dojrzały, z widoczną znajomością nowoczesnej syntezy organicznej, a w szczególności syntezy asymetrycznej oraz zagadnienia ortogonalności grup ochronnych. Zawartość tej części rozprawy doktorskiej uwzględnia opis zagadnień bezpośrednio związanych z częścią badawczą projektu doktorskiego, mianowicie dyskusję metod syntezy zdefiniowanych konfiguracyjnie pochodnych kwasu glutaminowego zawierających w pozycji β lub γ grupę hydroksylową, właściwości tej grupy związków oraz występowanie w przyrodzie - głównie jako element budulcowy skomplikowanych strukturalnie związków o aktywności biologicznej, przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej.

Doktorantka opisała kilkanaście asymetrycznych syntez kwasu 3-hydroksyglutaminowego, między innymi z użyciem pochodnych L- lub D-seryny, azyrydiny, *N*-zabezpieczonego D-fenyloglicynolu, kwasu L-jabłkowego, D-glukozy oraz kwasu (R)- lub (S)-ketopinowego jako pomocnika chiralności.

Przegląd dostępnych w literaturze metod syntez został przedstawiony również dla kwasu 4-hydroksyglutaminowego, między innymi z 4-hydroksyproliny, kwasu piroglutaminowego, z wykorzystaniem izoksazolidiny jako związku pośredniego oraz poprzez C4-funkcjonalizację odpowiednio zabezpieczonego kwasu glutaminowego.

W rozdziale kolejnym *Omówienie wyników badań*, Doktorantka koncentruje się na syntezie zaplanowanych fosfonianowych analogów kwasów amino(hydroksy)karboksylowych. Motywacją do badań był fakt istnienia dużej puli związków o strukturze kwasów α -aminofosfonowych, α -aminofosfinowych, fosfono- i fosfinopeptydów które wykazują różnorodną aktywność biologiczną w tym zdolność do hamowania aktywności enzymów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, między innymi syntetazy glutaminy, proteazy serynowej, peptydazy leucyny czy dehydrogenazy pirogronianowej. Tą zdolność fosfonowych i fosfinowych analogów α -aminokwasów do selektywnej inhibicji enzymów tłumaczy się mechanizmem inhibicji kompetycyjnej czyli konkutowaniem z natywnym substratem o miejsce aktywne w enzymie co jest możliwe gdy struktury obu związków (w tym przypadku, α -aminokwasu oraz jego fosfonowego/fosfinowego analogu) są podobne. Ponieważ związki te posiadają przynajmniej jedno centrum chiralności, w wielu przypadkach obserwowano odmienną aktywność biologiczną izomerów różniącymi się konfiguracją absolutną, dlatego istotnym zagadnieniem dotyczącym preparatyki tych związków jest synteza optycznie czystych produktów i charakterystyka ich aktywności.

Doktorantka w swojej pracy badawczej zainteresowała się pochodnymi kwasu glutaminowego o natywnej konfiguracji względnej L, które w łańcuchu bocznym posiadają dodatkowe ugrupowanie aminowe i/lub hydroksylowe. Związki o podobnej strukturze wykazywały aktywność względem receptorów glutaminergicznych: jonotropowych (iGluR) oraz metabotropowych (mGluR), a selektywność oddziaływania była w niektórych przypadkach zależna od konfiguracji na centrach stereogenicznych cząsteczki. Doktorantka zaprojektowała **nowe** analogi kwasu glutaminowego, w których grupy α - oraz γ -karboksylowe zastąpiła ugrupowaniami fosfonowymi zaś węgiel w położeniu γ sfunkcjonalizowała grupą aminową lub hydroksylową. Zaprezentowane w literaturze fosfonowe analogi kwasu glutaminowego były aktywne względem metabotropowego receptora glutaminergicznego co powoduje, że można rozważać je jako potencjalne terapeutyki w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, depresji czy epilepsji. Doktorantka założyła, że wprowadzone modyfikacje kwasu glutaminowego będą skutkować silniejszym oddziaływaniem związków w miejscu aktywnym receptora.

Zadania syntetyczne Doktorantka klarownie przedstawiła stosując logiczny ich podział na kilka etapów, wynikający z wcześniej przeprowadzonej retrosyntezy. W wielu miejscach widać skrupulatne dążenie Doktorantki do osiągnięcia jak najlepszych rezultatów syntetycznych poprzez optymalizację procedur lub testowanie alternatywnych wariantów syntezy. Dzięki takiemu podejściu Doktorantka uzyskała bardzo dobre rezultaty: wysokie wydajności reakcji, skrócenie czasu reakcji oraz wysoką czystość optyczną produktów.

Wspólnym etapem syntezy dla otrzymania obu difosfonowych analogów kwasu glutaminowego była synteza nitronu (S), a następnie jego przekształcenie do enancjomerycznie czystych (R) i (S) aldehydów o strukturze 1-(N-Boc-amino)-3-oksopropylfosfonianu dietylu. Na tym etapie Doktorantka pokusiła się o opracowanie nowej ścieżki syntezy nitronu, w stosunku do uprzednio opracowanej w Zespole, poprzez utlenienie odpowiedniej drugorzędowej aminy za pomocą oksonu, co znacząco podwyższyło wydajność całkowitą syntezy jak również skróciło jej czas. Aby pozyskać czyste enancjomerycznie aldehydy, Doktorantka wykorzystwała technikę RP HPLC, przy czym rozdzielaniu poddała diastereoizomeryczną mieszaninę zacetylowanych izoksazolidyn, które były związkami pośrednimi w syntezie. W tym miejscu pracy oczekiwałabym załączenia chromatogramów z rozdzielania mieszanin diastereoizomerów, zwłaszcza, że jest to wynik determinujący czystość optyczną dalszych związków pośrednich i końcowego produktu.

Enancjomerycznie czyste aldehydy (R lub S) zostały przekształcone w estry kwasu (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego w reakcji Abramova z fosforynem dietylowym oraz w ester kwasu (1,3-diamino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego w reakcji Kabachnika-Fieldsa z fosforynem trietylowym i benzyloaminą. W obu przypadkach diastereoizomeryczne mieszaniny zostały rozdzielone techniką RP HPLC (analog z grupą γ -hydroksylową został wcześniej przekształcony do O-acetylowej lub alternatywnie O-p-nitrobenzoilowej pochodnej co podwyższyło skuteczność zastosowanej metody separacyjnej). W tym miejscu również dołączyłabym odpowiednie chromatogramy RP HPLC. Dla wszystkich stereoizomerycznych związków Doktorantka ustaliła konfigurację absolutną do czego wykorzystwała techniki spektroskopowe ^{31}P i ^1H NMR ich odpowiednio zderywatywowanych pochodnych.

Diastereoizomeryczne estry kwasów difosfonowych zostały poddane hydrolizie i/lub deprotekcji do docelowych kwasów difosfonowych. Zsyntetyzowane związki okazały się nie posiadać aktywności agonistycznej względem glutaminergicznych receptorów metabotropowych mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈.

Część pracy doktorskiej opisującą badania własne kończy rozdział *Podsumowanie*, gdzie Doktorantka opisuje w sposób skondensowany rezultaty swoich badań, metody które wykorzystwała do rozdzielania i identyfikacji związków, wskazując na elementy nowości naukowej.

Część eksperymentalna jest bardzo obszernym rozdziałem zawierającym protokoły syntez, dane spektralne i chromatograficzne. Objętość tej części pracy daje informację o ilości pracy eksperymentalnej jaką Doktorantka wykonała oraz o posiadanym warsztacie tak syntetycznym jak i analitycznym.

Kończąc recenzję chciałabym poprosić Doktorantkę o komentarz do następujących spostrzeżeń Recenzenta:

- czy związek L-SOP (**23**) można zaliczyć do fosfonowych analogów aminokwasów skoro węgiel γ kwasu glutaminowego został zastąpiony tlenem?
- przy konieczności otrzymania związków o określonej, żądanej konfiguracji absolutnej jedną z alternatyw dla syntezy asymetrycznej jest biokataliza. Czy znane są metody biokatalityczne syntezy fosfonowych/fosfinowych analogów L aminokwasów?
- czy symulacja komputerowa, np. QSAR stanowiłaby dogodne narzędzie dla dalszej modyfikacji/redukcji struktury zaproponowanych kwasów difosfonowych w kierunku uzyskania zakładanej aktywności biologicznej względem receptorów glutaminergicznych? Czy planowane jest zbadanie ich aktywności przeciwbakteryjnej lub przeciwgrzybiczej?

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi zbiór ważnych metod syntetycznych nad niebadanymi do tej pory difosfonowymi analogami kwasu glutaminowego. Praca spełnia wymagane dla projektów doktorskich kryterium nowości naukowej. Na podkreślenie zasługuje aktualność podejmowanej problematyki badawczej związanej z rozwojem chemii medycznej, u podstaw której leży – ogólnie ujmując - dobrostan społeczny.

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) i wnoszę wniosek do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Liwii Joanny Lebelt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

