

Autoreferat pracy doktorskiej pt.:

„Otrzymywanie nowych, wielofunkcyjnych pochodnych β -amyryny z tradycyjnego surowca roślinnego, poprzez selektywną funkcjonalizację protoescygeniny”.

Promotor:

Prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz

Promotor pomocniczy:

Dr Marcin Cybulski

Escyna jest mieszaniną saponin pozyskiwaną z kasztanowca (rośliny rodziny *Aesculus*). Saponiny zaliczamy do metabolitów wtórnych roślin typu glikozydów o krótkich łańcuchach oligosacharydowych, zawierających aglikony steroidowe lub trójterpenowe; w przypadku escyny są to pentacykliczne trójterpeny z grupy beta amyryny, głównie: escygenina, protoescygenina, baryngtogenol C i baryngtogenol D (różniące się krotnością i pozycją podstawienia grupami hydroksylowymi). Zróżnicowanie strukturalne escyn jest determinowane, oprócz struktury aglikonu, także typem podstawienia glikozydowego w pozycji O-3 oraz rodzajem i pozycją grup acylowych występujących w pierścieniu E. Saponiny kasztanowca są tradycyjnym surowcem etnofarmakologicznym oraz stanowią substancje aktywne licznych współczesnych preparatów farmaceutycznych. Podstawowym efektem terapeutycznym, potwierdzonym klinicznie, jest korzystne działanie na chorobowe zmiany naczyń żylnych, wobec czego preparaty escyn znajdują zastosowanie w leczeniu takich patologii jak żylaki i chroniczna niewydolność żylna. Wyraźna komponenta przeciwzapalna działania farmakologicznego escyn na poziomie tkankowym pozwala przypuszczać, że związki te mogą być przydatne w znacznie większym zakresie w obszarze niedomagań układu krążenia, które stanowią jedno z podstawowych zagrożeń zdrowotności współczesnych społeczeństw, a szczególnie interesująca wydaje się możliwość interwencji w stany zapalne śródbłonna, które są pierwszym etapem zmian prowadzących do incydentów krążeniowych o dramatycznych skutkach. Weryfikacja takich hipotez, zgodnie z wymaganiami współczesnej farmakologii molekularnej wymagałaby szczegółowych badań prowadzonych osobno na każdym ze składników mieszanin określanych zbiorczo mianem escyn. W naszej ocenie obecny stan technik separacyjnych nie rokuje możliwości opracowania procesu rozdziału natywnych składników mieszanin saponin kasztanowca, poza poziomem analitycznym i ewentualnie preparatywnym HPLC. Wobec tego przyjęliśmy radykalnie różną koncepcję, udostępnienia współczesnej chemii medycznej różnorodności strukturalnej wynikającej z biogenetycznych zdolności roślin *Aesculus*, koncentrując nasze

zainteresowania na głównym aglikonie saponin kasztanowca – protoescygeninie. Przyjęty sposób pozyskiwania nowych struktur polega na kontrolowanej degradacji hydrolitycznej wyjściowej mieszaniny escyn, co zasadniczo upraszcza jej skład chemiczny, a następnie wykorzystaniu głównego składnika trójterpenowego, jako prekursora zaprojektowanego *de novo* zbioru nowych pochodnych wytwarzanych metodami syntezy chemicznej. Podejście takie zapewnia możliwość adekwatnej kontroli jakości surowców i półproduktów a w szczególności substancji przeznaczonych do badań aktywności biologicznej, co jest niezbędnym warunkiem uznania prawidłowości wyników badań.

Założeniem mojej pracy było wykorzystanie trójterpenowego aglikonu – protoescygeniny (olean-12-eno-3 β ,16 α ,21 β ,22 α ,24,28-heksaol), otrzymanego po dwustopniowej hydrolizie dostępnej handlowo β -escyny, którą poddawałem transformacjom prowadzącym do pochodnych o wyższym stopniu podstawienia. Początkowo nadrzędnym celem prac syntetycznych było opracowanie metody otrzymywania pochodnej możliwie wiernie naśladującej pod względem strukturalnym naturalnie występujące saponiny. Otrzymanie takiego mimetyku w dużym uproszczeniu zakłada podstawienie grup hydroksylowych w położeniach C3 (miejsce kluczowe, w którym do sapogeniny podłączona jest część cukrowa – tworząc saponinę) oraz C21 i/lub C22. Trudność polega na przeprowadzeniu przemian pozwalających w kontrolowany sposób sterować selektywnością podstawiania grup hydroksylowych. W toku prac stało się oczywiste, że w cząsteczce heksaolu selektywne funkcjonalizacje oraz dobranie właściwych grup zabezpieczających i sposobu ich odbezpieczenia stanowi wyzwanie samo w sobie. Właśnie dlatego większość swojej pracy poświęciłem na weryfikację użyteczności kilku najpopularniejszych metod zabezpieczenia grupy hydroksylowej.

Grupy zabezpieczające, jakie sprawdziłem:

- ✓ Acetale (np. O-izopropyliden)
- ✓ Grupy silylowe (np. t-butyl-di-fenylsilyl; t-butyl-di-metylsilyl; tri-izopropylsilyl)
- ✓ Trytyle
- ✓ Grupy benzylowe (np. nitro-, chloro-, metoksy-benzylowe)
- ✓ Allyle
- ✓ Grupa mesylova i tosylova
- ✓ Grupy difenylometylowe

Zabezpieczone w korzystny sposób pochodne mogłem poddawać kolejnym przemianom. Powstała seria pochodnych będących połączeniem trójterpenu sfunkcjonalizowanego eterem propargilowym (wiązanie potrójne) z azydkami, głównie zabezpieczonymi azydocukrami. Stworzenie takiej serii pozwoliło sprawdzić metody selektywnego zdejmowania grup zabezpieczających o odmiennej naturze chemicznej w cząsteczkach złożonych z części cukrowej i aglikonu.

Równolegle podjąłem się modyfikacji grupy hydroksylowej w ugrupowanie o innym charakterze chemicznym. W sposób bezpośredni (wymiana jednej grupy na inną) lub

pośredni (poprzez łącznik) chciałem selektywnie wprowadzić do struktury protoescygeniny następujące grupy:

- ✓ Aminową – reakcja typu Mitsunobu z ftalimidem i hydroksyftalimidem; eteryfikacje z bromoalkiloftalimidami.
- ✓ Karbonylową – utlenianie pięcioma najczęściej spotykanymi w literaturze metodami (TEMPO; odcz. Dess-Martina; KMnO_4 ; sole żelaza (III), kompleksowane CrO_3); pośrednio przez bromooctan metylu.
- ✓ Azydkową.
- ✓ Heteroatom – różne warianty reakcji Appela; pośrednio przez eter bischloroetylowy.

Przekształcenia takie pełnią dwojaką funkcję. Z jednej strony otwierają dostęp do nowych typów reakcji prowadzących do dalszych pochodnych, z drugiej zmiana natury grupy może działać jak forma zabezpieczenia – wyłączając daną pozycję z możliwości konkretnego podstawienia.

W trakcie badań nad otrzymywaniem nowych pochodnych protoescygeniny osiągnięto stan dostępności tego surowca, w zwalidowanym procesie skali wielkolaboratoryjnej, który nie wymaga stosowania technik sorpcyjnych do osiągnięcia wysokiej czystości chemicznej. Celem powyższego przeglądu metodycznego było wytypowanie reakcji częściowego zabezpieczania układu heksaolu protoescygeniny, rokujących powodzenie kontynuacji procesu wydzielania i oczyszczania kolejnego półproduktu na drodze prostej krystalizacji. Wyniki większości prób okazały się z tego punktu widzenia negatywne, to znaczy uzyskane mieszaniny poreakcyjne kwalifikowały się jedynie do rozdzielenia składników na drodze chromatografii. Jednakże cel przekształcenia protoescygeniny w pochodną z selektywnie zabezpieczonymi grupami hydroksyłowymi, którą można wyodrębnić i oczyścić metodą krystalizacji, został osiągnięty przez podwójną lecz jednoetapową ketalizację. W ten sposób zapewniono techniczną dostępność kluczowego półproduktu do wytwarzania zbiorów pochodnych w prostych reakcjach acylowania i alkilowania. Zademonstrowano możliwości kolejnych etapów derywatyzacji wprowadzając pożądaną do badań aktywności biologicznej różnorodność strukturalną, na przykład poprzez zastosowanie przyjaznych metodycznie procedur dipolarnych cykloaddycji („*click chemistry*”) prowadzących do układu 1,2,3-triazoli na złączu wybranych syntonów.