



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30

fax: 61 854-66-39

e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 25 sierpnia 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Nukleozydo Boranofosfoniany – Badania Mechanistyczne i Syntetyczne**

Imię i nazwisko: **mgr Justyna Gołębiewska**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

Promotor: **prof. dr hab. Jacek Stawiński**

Promotor pomocniczy: **dr Joanna Romanowska**

Podczas realizacji pracy doktorskiej Pani mgr Justyna Gołębiewska włączyła się w badania analogów nukleotydów, a więc w tematykę, która jest rozwijana z bardzo interesującymi rezultatami w Zakładzie Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych IChB PAN w Poznaniu pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pana prof. dr hab. Jacka Stawińskiego i promotora pomocniczego Pani dr Joanny Romanowskiej. Zagadnienie badawcze sformułowane w temacie pracy, a dotyczące **badania w zakresie syntezy chemicznej i mechanizmów reakcji w obrębie nukleozydo boranofosfonianów** z jednej strony dotyka szeregu zagadnień szczegółowych zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat tej grupy związków, w szczególności oceny reaktywności grupy boranowej wchodzącej w zakres ich struktury chemicznej. Jednakże w szerszym znaczeniu pozwala na poszerzenie wiedzy na temat chemii kwasów nukleinowych, stwarza perspektywy poszukiwań nowych substancji aktywnych farmaceutycznie, które także będzie można zastosować w syntezie chemicznej do otrzymywania oligonukleotydów. Zwykle, nawet dość szczegółowe badania podejmowane w pracach doktorskich mają pionierów, którzy z uwagi na perspektywę czasową zdążyli zostać nagrodzeni prestiżowymi nagrodami. Tym razem jednak przedmiotowa praca doktorska jest tylko nieznacznie w czasie oddalona od wstępnych prac w tym zakresie, sytuując tym samym podjęty temat badawczy w głównym nurcie wytyczania nowych kierunków badań.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Gołębiewskiej stanowi spójny tematycznie zbiór trzech publikacji opatrzonych: Streszczeniami w języku polskim i angielskim, Oświadczeniami współautorów, Zestawieniem dorobku naukowego oraz 30 stronicowym Opiszem wyników, na który składa się: (i) Wprowadzenie, (ii) Cel pracy, (iii) Skrótowy opis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, (iv) Podsumowanie, (v) Bibliografia. Poszczególne rozdziały zostały napisane poprawnym językiem naukowym. Kolejność przedstawiania danych i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Piśmiennictwo Opisu wyników liczy 20 odpowiednio dobranych odnośników literaturowych.

Doktorantka dokonała właściwego wyboru tematyki do **Wprowadzenia**, w którym zawarła informacje na temat nukleozydo boranofosfonianów, odwołując się do pionierskich prac w tym zakresie, począwszy od

badania autorstwa A. Sood, B. R. Shaw i B. F. Spielvogel, opublikowanych w *J. Am. Chem. Soc.* w 1990 r. W dalszej części omówiła właściwości fizykochemiczne tej grupy związków i uzasadniła ich atrakcyjność jako celu badań w biochemii i biologii. Zwróciła uwagę na fakt bardzo słabo przebadanego obszaru związanego z reaktywnością funkcji boranowej w nukleozydo boranofosfonianach. Warto dodać, że historia zajmowania się tym szczegółowym zagadnieniem sięga 2015 r., kiedy to M. H. Caruthers opublikował pierwszą publikację na ten temat w *J. Am. Chem. Soc.* Zaplanowane przez Doktorantkę w **Celu** pracy badania miały doprowadzić do oceny reaktywności funkcji boranowej nukleozydo boranofosfonianów wobec wybranych N-nukleofili w warunkach utleniających. Cel ten był konsekwentnie realizowany w badaniach zaprezentowanych w publikacjach. Sposób przedstawiania badań i ich interpretacji zawarty w **Publikacjach wchodzących w zakres rozprawy** oraz w **Skrótowym opisie publikacji** wskazują na biegłość Doktorantki w stosowanej metodologii i dokumentowaniu wyników. W rozdziale Skrótowy opis publikacji, Pani mgr Justyna Gołębiwska wyjaśniła kwestie nazewnictwa boranofosfonianów, a następnie metody wprowadzania funkcji boranowej do ugrupowania fosforanowego nukleotydów i oligonukleotydów.

Szczegółowe badania znajdujące się w poddanych ocenie pracach dotyczą w **Publikacji 1 – Wiadomości chemiczne 74 (2020) 9-10** – przeglądu literatury na temat metod wprowadzania motywu strukturalnego boranofosfonianu z użyciem metody amidofosforynowej, strategii H-fosfonianowej oraz z użyciem dedykowanych odczynników boranofosfonylujących. Doktorantka zawarła dane na temat chemicznej i enzymatycznej syntezy analogów oligonukleotydów ze stereozdefiniowanymi boranofosfonianowymi wiązaniami internukleotydowymi omawiając 5 podejść syntetycznych, takich jak amidofosforynowe, z wykorzystaniem H-fosfonianów, poprzez boranofosfonianotriestry, z użyciem H-boranofosfinianów, a także z zastosowaniem oksazafosfolidynowych pochodnych. Na końcu przedstawiła informacje dotyczące właściwości biologicznych nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfonianów, poruszając kwestie ich zastosowań w projektowaniu proleków przeciw wirusowi HIV, w wyciszaniu ekspresji genów, a także oddziaływań z enzymami. Należy podkreślić, że publikacja ta jest monoautorska i stanowi doskonałe kompendium, które sprawia, że zagadnienia eksperymentalne omawiane w publikacjach oryginalnych są lepiej zrozumiałe w kontekście starannie zebranego stanu wiedzy ze światowego piśmiennictwa.

Motywe przewodnim badań zawartych w **Publikacjach 2 i 3 – The Journal of Organic Chemistry 83 (2018) 5496-5505** oraz *The Journal of Organic Chemistry 85 (2020) 4312-4323*, stała się weryfikacja zaproponowanych przez Caruthersa mechanizmów przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany (*J. Am. Chem. Soc.* 2015) oraz tworzenia pochodnych zawierających wiązanie P-B-N (*J. Org. Chem.* 2017). Pani mgr Justyna Gołębiwska zaplanowała i przeprowadziła wnikliwe badania dotyczące mechanizmu reakcji przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany. Szczególne wątpliwości Doktorantki wzbudzała kwestia poprawności postulowanej stereochemii całego przekształcenia opierającej się na retencji konfiguracji, a także sposobu przypisania absolutnej konfiguracji finalnego dinukleozydo ($3'$ - $5'$) amidofosforanu za pomocą eksperymentu NOESY. Stereochemię badanej reakcji postanowiła oprzeć o analizę stereochemiczną wspomnianego dinukleozydo ($3'$ - $5'$) amidofosforanu i jego porównanie z analogicznym produktem otrzymanym w oparciu o inną i stereochemicznie zdefiniowaną ścieżkę syntetyczną. W schemacie stereochemicznej analizy korelacyjnej związkiem centralnym była mieszanina 1:2 diastereoizomerów dinukleozydo ($3'$ - $5'$) H-fosfonianu, którą użyła do otrzymania dinukleozydo ($3'$ - $5'$)

amidofosforanu w formie mieszaniny diastereoizomerów w stosunku 1:2, zarówno na drodze oksydatywnej kondensacji z *n*-butyloaminą lub po przekształceniu w boranofosfonian, a następnie utlenieniu wobec tej samej aminy. Analiza widm ^{31}P NMR substratów i produktów reakcji okazała się bardzo pomocna przy ocenie stereochemii obu reakcji. Analizując znaną z piśmiennictwa stereochemię oksydatywnej kondensacji H-fosfonianów z aminami przebiegającą z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, Pani mgr Justyna Gołębiowska słusznie zauważyła zachodzenie przekształcenia boranofosfonianów w amidofosforany z całkowitą inwersją konfiguracji, wbrew postulowanej literaturowo retencji. Wyjaśniła także w tym miejscu mechanizm podstawienia grupy jodoboranowej jodem zachodzący z retencją konfiguracji na atomie fosforu, proponując tworzenie się anionu fosfonianowego i poszukując dowodów na tworzenie się diestrów H-fosfonianów jako produktów pośrednich. Zaproponowany przez Doktorantkę mechanizm okazał się zgodny z obserwowaną stereochemią tworzenia amidofosforanów z boranofosfonianu i tłumaczył ponadstechiometryczne zużycie jodu i aminy w tej reakcji. Kolejny duży wątek badawczy dotyczył reakcji boranofosfonianów z III rzędownymi i heteroaromatycznymi aminami w obecności jodu, prowadzących do tworzenia produktów z ugrupowaniami P-B-N, określonych jako B-pirydynio- i B-amonioboranofosfoniany. Doktorantka w swoich badaniach podjęła bardzo interesującą analizę niedawno opublikowanych i wyżej wspomnianych prac z grupy Caruthersa. Zainteresowała się kwestią zasadności zaproponowanych w tych badaniach dwóch odrębnych mechanizmów reakcji, osobno dla I i II rzędownych amin oraz III rzędownych amin i związków heteroaromatycznych. Sformułowana na początku badań i dalej weryfikowana hipoteza wskazywała, że diestry boranofosfonianowe reagują z aminami wobec jodu podobnie, niezależnie od użytej aminy, a także że silnie elektrofilowy λ^3 -boranofosfonian jest dalej koordynowany przez odpowiednią aminę z utworzeniem kompleksu. Stabilność owego kompleksu była zróżnicowana w zależności od typu aminy. W przypadku amin I i II rzędownych powstawały aminoboranofosforany, które rozpadały się do odpowiedniego H-fosfonianu przekształcanego podczas reakcji utleniania w amidofosforan. Z kolei w przypadku amin III rzędownych i heterocyklicznych tworzyły się trwałe i stabilne kompleksy typu amina- λ^3 -boranofosfonian. Chciałbym zwrócić uwagę na bardzo pouczające eksperymenty wstępne, które pozwoliły na dokonanie oceny reaktywności boranofosfonianów z III rzędownymi aminami w zależności od użytego rozpuszczalnika, czyli dichlorometanu lub acetonitrylu. W tym miejscu Doktorantka wskazała na przekształcanie się adduktu pirydyna- λ^3 -boranofosfonian w czasie 30-60 minut do pirofosforanu tetraetylowego w oparciu o nukleofilowy atak anionu jodkowego na pierścień pirydyniowy. Przy lekturze tej części pracy pojawiło się kilka pytań, do których prosiłbym Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas publicznej obrony. *Biorąc pod uwagę, że wspomniana powyżej transformacja adduktu do pirofosforanu tetraetylowego zachodziła w acetonitrylu, zastanawiam się, czy oceniono wpływ promieniowania UV-vis? Czy wykreślono widmo absorpcyjne dla adduktu pirydyna- λ^3 -boranofosfonian? Czy roztwory rozpuszczalników, w których prowadzono reakcje zostały odgazowane?* Doktorantka wyjaśniła także syntezę produktu ubocznego – dipirydynioboranofosfonianu w dichlorometanie. Co ciekawe, taki produkt uboczny nie tworzył się w acetonitrylu. *Czy przeanalizowano na tym etapie wpływ promieniowania UV-vis? Czy brano pod uwagę możliwość równoległego zachodzenia reakcji rodnikowych w tych warunkach, w tym katalizowanych tworzącymi się aminoboranofosfonianowymi kompleksami?* W dalszej części Doktorantka przeprowadziła bardzo ważny eksperyment, który pozwolił na wyjaśnienie różnic

w reaktywności boranofosfonianów w dichlorometanie i acetonitrylu. Mianowicie, zastosowanie w eksperymentach z preaktywacją, w której tworzył się jodoboranofosfonian, pirydyny i 2,6-lutydyny, rzuciło nowe światło na rolę jodoboranofosfonianu w syntezie adduktów amina- λ^3 -boranofosfonian, pozwalając na wykluczenie tej ścieżki reakcyjnej. W kolejnych badaniach Doktorantka oceniła prowadzenie reakcji preaktywacji boranofosfonianów w szeregu rozpuszczalników: 1,2-dimetoksyetanie, dioksanie, tetrahydrofuranie, dimetyloformamidzie i toluenie, co pozwoliło m.in. na zidentyfikowanie nowego adduktu tetrahydrofuran- λ^3 -boranofosfonian. Dużą część badań poświęciła także procesowi utleniania boranofosfonianów w układzie jodu i aminy. Kluczowe było zauważenie równouprawnionego udziału jodu cząsteczkowego lub jego kompleksów z aminami w procesie utleniania grupy boranowej. Ostatni etap badań dotyczył określenia roli etapu, na którym dochodzi do utleniania jonu wodorkowego grupy boranowej w mechanizmie reakcji diestrów boranofosfonianów z aminami w obecności jodu. Pani mgr Justyna Gołębowska przedstawiała bardzo rzeczową dyskusję zaproponowanych trzech mechanizmów reakcji diestrów boranofosfonianowych z I, II i III rzędowymi aminami w obecności jodu. Najważniejsze wyniki i wnioski z badań zostały następnie przedstawione w **Podsumowaniu**.

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Gołębowskiej zawarta w cyklu trzech artykułów naukowych jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Praca była realizowana według dobrze przemyślanego schematu, co pozwoliło na zweryfikowanie wielu hipotez. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca oceny reaktywności grupy boranowej w nukleozydo boranofosfonianach w miarę postępu badań została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wniosków, wskazujących na możliwości wykorzystania przekształceń w obrębie tej grupy do otrzymywania nowych analogów oraz pochodnych, w tym oligonukleotydowych, o potencjalnym znaczeniu w medycynie. Uzyskane dane eksperymentalne zostały w przedstawionych do oceny pracach krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i bezpośrednich doświadczeń Zespołu. Uzyskane wyniki mają więc duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład do chemii kwasów nukleinowych. Do głównych osiągnięć będących wynikiem realizacji poddanej mojej ocenie dysertacji zaliczam: (i) ustalenie poprawnej stereochemii reakcji oraz mechanizmu przekształcania nukleozydo boranofosfonianów w amidofosforany z aminami I i II rzędowymi w obecności jodu; (ii) zbadanie reakcji boranofosfoniano diestrów z aminami III rzędowymi i heterocyklicznymi wobec jodu prowadzącej do utworzenia motywu strukturalnego P-B-N; (iii) wykazanie, że dla reaktywności boranofosfonianów kluczowe znaczenie ma rodzaj użytego rozpuszczalnika; (iv) zidentyfikowanie i poznanie reaktywności nieznanych wcześniej boranofosfonianów, w tym jodoboranofosfonianów, a także ich adduktów z acetonitrylem i tetrahydrofuranem oraz nowych pochodnych typu amina- λ^3 -boranofosfonian; (v) wykazanie możliwości modyfikacji adduktów amin z boranofosfonianami na centrum boranowym poprzez uzyskanie nowego diestru boranofosfonianowego z dwiema cząsteczkami pirydyny na centrum boranowym. Należy dodać, że w świetle załączonych oświadczeń współautorów, wkład Pani mgr Justyny Gołębowskiej w powstanie publikacji jest znaczący. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawione i już opublikowane dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną, gdyż Doktorantka (i) znacząco poszerzyła wiedzę na temat reaktywności nukleozydo boranofosfonianów; (ii) podjęła się prowadzenia badań bardzo aktualnych naukowo i zastosowała nowoczesny warsztat badawczy, który pozwolił na opracowanie ogólnego mechanizmu reakcji


boranofosfonianów z aminami, wyjaśniającego powstawanie pochodnych P-N dla amin I i II rzędowych oraz P-B-N dla amin III rzędowych i heterocyklicznych; (iii) wskazała perspektywy dalszych ciekawych badań podstawowych i aplikacyjnych dla boranofosfonianów, jako markerów chemicznych w modyfikowanych oligonukleotydach o potencjalnym znaczeniu zarówno w syntezie chemicznej, jak i chemii medycznej.

Pani mgr Justyna Gołębiwska posiada w mojej ocenie bardzo dobry dorobek naukowy, jest pierwszym lub jedynym autorem czterech publikacji w czasopismach takich jak *Wiadomości Chemiczne*, dwukrotnie *The Journal of Organic Chemistry*, a także *European Journal of Medicinal Chemistry*. Ponadto jest współautorem dwóch rozdziałów w książkach z serii *Na Pograniczu Chemii i Biologii* z lat 2014 i 2018. Jest także współautorką zgłoszenia patentowego do UP RP z 2017 r. Warto dodać, że wyniki badań zaprezentowała w formie komunikatów ustnych, dwukrotnie na konferencjach krajowych i jeden raz na konferencji zagranicznej. Była lub wciąż jest zaangażowana jako wykonawca i kierownik realizowanych trzech grantów badawczych z NCN, NCBiR oraz IChB PAN. Szczególnie istotne jest kierowanie i realizacja grantu Preludium od 2019 r.

Wszystkie rozdziały i prace eksperymentalne zawarte w dysertacji zostały napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Zwracam uwagę na drobne kwestie, które pojawiły się podczas czytania pracy i poproszę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony: (i) *Streszczenie – Odnoszę wrażenie, że Doktorantka miała na myśli w większym stopniu ligand niż farmakofor myśląc o badanych w pracy nukleozydo boranofosfonianach. Jak zatem definiujemy farmakofor?;* (ii) s. 25 – *Sugerowałbym wyrażenie – diestry boranofosfonianowe, w miejsce – boranofosfoniany diestry. Warto też unikać konstrukcji językowej – Badania nad reakcją, sugeruję po prostu – Badania przebiegu reakcji;* (iii) *Publikacja, s. 12 – w metodzie IV zapewne chodzi o H-boranofosfiniany.*

Reasumując uważam, że Pani mgr Justyna Gołębiwska wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym, mierząc się wzorcowo z postawionym w temacie pracy problemem. Moja bardzo wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu syntezy chemicznej i fizycznej chemii organicznej. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Justyny Gołębiwskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


prof. dr hab. Tomasz Gośliński



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 25 sierpnia 2020 r.

Szanowny Pan
dr hab. Michał Sobkowski
Z-ca Dyrektora d/s Naukowych
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

Szanowny Panie Profesorze

zwracam się z uprzejmą prośbą o przedstawienie Wysokiej Radzie Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN propozycji wyróżnienia pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Gołębowskiej pt. „Nukleozydo Boranofosfoniany – Badania Mechanistyczne i Syntetyczne”. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawione i już opublikowane dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną, gdyż Doktorantka (i) znacząco poszerzyła wiedzę na temat reaktywności nukleozydo boranofosfonianów; (ii) podjęła się prowadzenia badań bardzo aktualnych naukowo i zastosowała nowoczesny warsztat badawczy, który pozwolił na opracowanie ogólnego mechanizmu reakcji boranofosfonianów z aminami, wyjaśniającego powstawanie pochodnych P-N dla amin I i II rzędowych oraz P-B-N dla amin III rzędowych i heterocyklicznych; (iii) wskazała perspektywy dalszych ciekawych badań podstawowych i aplikacyjnych dla boranofosfonianów, jako markerów chemicznych w modyfikowanych oligonukleotydach o potencjalnym znaczeniu zarówno w syntezie chemicznej, jak i chemii medycznej.

Upowszechnione dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną, duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład do chemii kwasów nukleinowych. Świadczą o tym w sposób wymierny cztery publikacje opublikowane w czasopismach takich jak *Wiadomości Chemiczne*, dwukrotnie *The Journal of Organic Chemistry*, a także *European Journal of Medicinal Chemistry*. Ponadto Doktorantka przygotowała dwa rozdziały w książkach z serii *Na Pograniczu Chemii i Biologii* w latach 2014 i 2018. Doktorantka jest także współautorką zgłoszenia patentowego do UP RP z 2017 r. Warto dodać, że wyniki badań zaprezentowała w formie komunikatów ustnych, dwukrotnie na konferencjach krajowych i jeden raz na konferencji zagranicznej. Była lub wciąż jest zaangażowana jako wykonawca i kierownik w trzy granty badawcze z NCN, NCBiR oraz IChB PAN. Szczególnie istotne jest kierowanie i realizacja grantu Preludium od 2019 r.

Z pozdrowieniem

Tomasz Gośliński

prof. dr hab. Tomasz Gośliński