



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Dr hab. Sławomir Makowiec prof. PG
Katedra Chemii Organicznej
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 24-05-2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Bazana pt.
„Poszukiwanie bioortogonalnych reakcji hetero-Dielsa-Aldera 1-oksa-1,3-butadienów i
alkenów jako nowych narzędzi w tworzeniu bioortogonalnej ligacji pomiędzy badanym
obiektem i znacznikiem”**

Metody obrazowania są dziś w medycynie i naukach pokrewnych kluczowym narzędziem diagnostycznym pozwalającym dosłownie zajrzeć w głąb żywego organizmu i zaobserwować funkcjonowanie narządów, zmiany patologiczne czy uszkodzenia tkanek. Szczególnym przypadkiem jest obrazowanie na poziomie komórkowym z obserwacją wybranych organelli komórkowych. Metody obrazowania często wiążą się z wprowadzeniem do żywego organizmu molekuł wchodzących w interakcje z promieniowaniem elektromagnetycznym. Zejście na poziom mikrobiologiczny wymaga od technik obrazowania szczególnej precyzji, wymagającej selektywnego znakowania konkretnych cząsteczek wykorzystując istniejące w nich grupy funkcyjne jako punkty kowalencyjnego zakotwiczenia znaczników. Niezmiernie ważnym wymaganiem stawianym technikom obrazowania jest niezaburzenie normalnego funkcjonowania komórki, innymi słowy cząsteczki wprowadzone do żywej komórki mają być bioortogonalne do indywiduów chemicznych i biochemicznych obecnych w komórce. Tematyka bioortogonalnych reakcji hetero-Dielsa-Aldera zwróciła uwagę mgr Bartłomieja Bazana doktoranta w zespole profesor Aleksandry Pałasz stając się tematyką przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Mgr Bartłomiej Bazan zajął się aktualnym problemem jaki stawia biochemia przed chemikami zajmującymi się syntezą organiczną – otrzymaniem struktury ulegającej selektywnemu i szybkiemu przyłączaniu do np. modyfikowanej cząsteczki leku znajdującej się wewnątrz komórki, z jednoczesnym przeniesieniem przez tą strukturę fragmentu zdolnego do fluorescencji. Dlatego też sedno rozprawy stanowią badania nad otrzymaniem nowych układów heterodienowych o odwróconym zapotrzebowaniu na elektrony pozwalające na efektywne przeprowadzenie cykloaddycji [4+2] wewnątrz żywej komórki.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została napisana na 146 stronach i zawiera wszystkie tradycyjnie uznane elementy takie jak: Część literaturowa, Badania Własne, Część Eksperymentalną oraz Cytowaną Literaturę a także nieco ukryty Cel badań. Układ pracy jest klasyczny a sposób prowadzenia narracji w szczególności w najważniejszym elemencie, czyli w „Badaniach Własnych” typowy dla rozpraw technicznych.

Wstęp literaturowy przedstawiony został na około 40 stronach jest on ściśle związany z tematyką prowadzonych przez Autora eksperymentów. Zawiera podrozdziały konieczne do wyjaśnienia kluczowych pojęć bioortogonalności, reakcji hetero-Dielsa-Aldera a także dokonuje wyczerpującego przeglądu znanych obecnie bioortogonalnych reakcji chemicznych. Do części teoretycznej mam jedynie uwagę techniczną – w otrzymanej przeze mnie wersji rozdzielczość struktur chemicznych na rysunku nr 25 mocno odbiega od rozdzielczości pozostałych struktur w manuskrypcie.

Za cel badawczy Doktorant postawił sobie zastosowanie układów 1-oksa-1,3-butadienowych w reakcji hetero-Dielsa-Aldera do wytworzenia bioortogonalnej ligacji. Zadania cząstkowe zakładały syntezę substratów do cykloadycji, przeprowadzenie reakcji hetero-Dielsa-Aldera w warunkach laboratoryjnych, wyznaczenie stałej szybkości reakcji, a następnie przeprowadzenie reakcji hetero-Dielsa-Aldera wewnątrz żywych komórek. Tak postawione zadanie badawcze jest spójne i racjonalne oraz wartościowe naukowo, jednak ze względu na konieczność spełnienia często wykluczających się wymagań trudne do zrealizowania. Dla zobrazowania poziomu trudności można przytoczyć fakt, iż projektowane przez Doktoranta związki muszą być bierne chemicznie wobec całej gamy indywidualów chemicznych obecnych w żywej komórce, jednakże z drugiej strony mają możliwie szybko reagować ze znakowaną cząsteczką w niskiej temperaturze przy niskich stężeniach reagentów, czyli być selektywnie nadzwyczaj reaktywne.

Rozdział Badań Własnych rozpoczyna Autor od opisu przygotowania taksolu modyfikowanego fragmentem winylowego tioeteru, który będzie w dalszym toku badań użyty jako jeden z kluczowych reagentów do testowania użyteczności nowych otrzymanych przez Doktoranta heterodienów. Przedstawione w tym podrozdziale procesy jakkolwiek są odtworzeniem opisanych w literaturze syntez nie należą jednak do reakcji trywialnych. Dlatego też chciałbym zapytać w tym miejscu o dwa zagadnienia. Jak wiadomo otrzymywanie tioeterów winylowych nie jest procesem łatwym, niskie wydajności w tego typu procesach są raczej regułą. Czy Autor rozpatrywał użycie innej metody syntezy eteru winylowego niż bezpośrednia reakcja tiolanu z bromkiem winylu? Natomiast drugie pytanie dotyczy problemu selektywnej funkcjonalizacji taksolu. Czy Autor obserwował powstawanie produktu acylowania na drugiej drugorzędowej grupie hydroksylowej w pierwszym etapie z użyciem Z-Cl, jak bardzo selektywna była ta procedura? W cytowanej pracy Guy and Nicolaou także nie wspominają nic o straconych przynajmniej 30% taksolu.

Kolejne zadanie badawcze zakładało syntezę heterodienu z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym. Cząsteczki pozwalającej na przeprowadzenie reakcji *click* a jednocześnie zawierającej grupę funkcyjną do przyłączenia barwnika fluorescencyjnego. Pierwszy etap tego procesu powiódł się zgodnie z oczekiwaniem, natomiast barierą okazało się aktywowanie grupy karboksylowej tak aby możliwe było przyłączenie pochodnej fluoresceiny. Odnośnie nieudanych prób uzyskania chlorku kwasowego, czy niepowodzenie mogło wynikać z reakcji SOCl_2 z ugrupowaniem amidowym kwasu barbiturowego i tworzeniem produktu typu Vilsmeiera-Haack'a? Czy Doktorant próbował wprowadzić katalityczną ilość DMF do tej reakcji? Inna sprawa czy zakładając późniejsze sprzężenie z aminofluoresceiną nie byłoby stosowne spróbować reakcji związku **130** bezpośrednio z aminofluoresceiną w obecności np. solu uroniowych typu TBTU?

Autor rozprawy rozpoczął wielowątkowe poszukiwania obejścia tego problemu, syntezując między innymi podobny układ heterodienu z grupą hydroksymetylenową jako łącznikiem, gdzie również wystąpił problem z reaktywnością linkera. Analizując ten problem przyznam, że nie podzielał jednak zdania Doktoranta, że za zmniejszenie nukleofilowości grupy hydroksylowej odpowiada (tylko) efekt elektronoakceptorowy fragmentu kwasu barbiturowego, podejrzewałbym w tym miejscu wpływ innych czynników. Natomiast odnośnie reakcji przedstawionej na rysunku nr 60, gdzie po niepowodzeniu z wodorolizą, autor rozprawy podjął alternatywne działania w celu usunięcia grupy Cbz. Zastanawiam się dlaczego do usunięcia grupy Cbz próbowano zastosować wodny roztwór HCl, lub przewidywalnie nieskuteczny w tej sytuacji TFA zamiast standardowego HBr w kwasie octowym?

Należy jednak podkreślić, iż finalnie Autor znalazł skuteczne obejście napotkanych problemów syntezując modyfikowany heterodien z funkcją aminową a następnie z sukcesem dokonał sprzęgania z izotiocyanianem fluoresceiny. Trzeba dodać, iż takie podejście nie było oczywiste, uzyskany heterodien **153** musiał zawierać pierwszorzędową grupę aminową (utrzymywaną co prawda do czasu reakcji w postaci trifluorooctanu) a jednocześnie elektrofilowy fragment typowego akceptora Michaela. Dlatego w tym miejscu należy się Doktorantowi uznanie za skutecznie przeprowadzony proces.

Zakończony sukcesem proces otrzymywania funkcjonalizowanego heterodienu musiał się oczywiście wiązać z koniecznością przetestowania tegoż dienu w reakcji z dienofilem, którą Doktorant również przeprowadził z powodzeniem. Mam jednak zastrzeżenie odnośnie opisu i rysunku dotyczącego otrzymywania związku **155**. Tekst rozprawy informuje nas, że „otrzymano z wydajnością 53% tylko jeden diastereoizomer **155**” na rysunku znajduje się tylko jeden z pary stereoizomerów *trans*. Rozumiem, że to uproszczenie i dla ułatwienia nie umieszczono drugiej struktury. Nie mniej jednak dodanie symbolu (+/-) rozwiałoby wszelkie wątpliwości. Natomiast w części eksperymentalnej znajduje się nazwa „2,2,2-Trifluorooctan 2-(4-((5*R*,7*S*)-7-((2-hydroksyetylo)tio)-1,3-dimetylo-2,4-diokso-1,3,4,5,6,7-heksahydro-2*H*-pirano[2,3-*d*]pirymidyno-5-yl)fenoksy)etanaminowy” sugerująca powstawanie w tej reakcji tylko jednego stereoizomeru (5*R*,7*S*) zamiast pary enancjomerów (5*R*,7*S*) i (5*S*,7*R*).

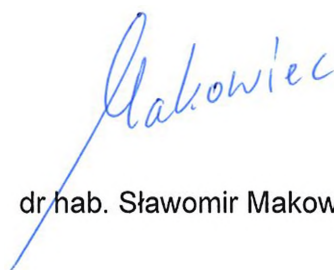
Wartościowym z punktu widzenia naukowego a zarazem pracochłonnym było wyznaczenie przez mgr Bartłomieja Bazana stałych szybkości reakcji heterodienów z tioeterem winylowym. Pomiary te prowadzone były z wieloma powtórzeniami za pomocą dwóch różnych metod, widać w tym rzetelność naukową badacza. Uzyskane wyniki są powtarzalne niezależnie od metody. Można by oczywiście dywagować w tym momencie czy dla posiadania pełnej wiedzy na temat stałych szybkości reakcji nie byłoby stosowne przeprowadzenie pomiaru metodą pośrednią również w D₂O.

Co ważne uzyskane w trakcie syntezy związki zostały zweryfikowane pod kątem stabilności w warunkach fizjologicznych również w obecności cysteiny - posiadającej powinowactwo do heterodienów. Stabilność związków analizowana była za pomocą techniki LC-MS i na widmach MS widać jednoznacznie, że badane indywidualnie chemiczne wytrzymują okres 24h w podanych warunkach. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy nie było możliwe ilościowe oznaczenie zawartości związków **153** i **155** po wskazanym czasie?

Mimo poczynionych uwag rozprawę oceniam pozytywnie. Stawiane przeze mnie pytania są elementem dyskusji naukowej nad wynikami badań przedstawionymi przez mgr

Bartłomieja Bazana nie podważając ich wartości naukowej. Doktorant osiągnął zamierzone cele badawcze i zgromadził znaczący materiał badawczy, który nosi cechy nowości naukowej. Wyniki badań naukowych przeprowadzonych przez Doktoranta stały się treścią publikacji w renomowanym czasopiśmie naukowym *Org. Biomol. Chem.*, 2021, 19, 6045-6058.

Stwierdzam, iż rozprawa zatytułowana „Poszukiwanie bioortogonalnych reakcji hetero-Dielsa-Aldera 1-oksa-1,3-butadienów i alkenów jako nowych narzędzi w tworzeniu bioortogonalnej ligacji pomiędzy badanym obiektem i znacznikiem”, spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i w konsekwencji wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Kandydata do stopnia naukowego doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Sławomir Makowiec, prof. PG