

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Ewy Radzikowskiej zatytułowanej *"Synteza oligodeoksyrybonukleotydów modyfikowanych w obrębie wiązań internukleotydowych atomem azotu lub siarki"* przedstawionej Radzie Naukowej CBM i M PAN w Łodzi

Co raz lepsze zrozumienie przyczyn powstawania zjawisk chorobowych na poziomie molekularnym skutkowało w końcu ubiegłego wieku pojawieniem się tzw. strategii antysensowej w poszukiwaniu nowej generacji leków, które mogłyby umożliwić przyczynowe leczenie chorób poprzez precyzyjną interwencję molekularną na źródła procesów chorobotwórczych. Leki tego rodzaju poprzez specyficzne oddziaływanie (hybrydyzację) z rozpoznanym konkretnym fragmentem DNA (genem) lub mRNA pozwalałyby na zablokowanie procesu replikacji, transkrypcji bądź translacji związanego z procesem chorobotwórczym. Najbardziej obiecującą grupą związków o pożądanej dla tych celów charakterystyce stają się oligonukleotydy o komplementarnych do docelowej nici sekwencjach zasad ale zmodyfikowane strukturalnie w obrębie wiązań internukleotydowych. Modyfikacje te polegają przede wszystkim na zastąpieniu grupy fosforylowej ( $P=O$ ) grupą tiofosforylową ( $P=S$ ) lub zastąpieniu jednego wiązania estrowego wiązaniem amidowym ( $N-P$ ), bądź też obu tych modyfikacji jednocześnie ( $N-P=S$ ). Okazało się bowiem, że takie modyfikowane oligonukleotydy wykazują kompetencyjne zdolności wiążące w porównaniu do naturalnych oligonukleotydów i co istotne, są bardziej odporne na działanie wewnątrzkomórkowych nukleaz. Zamiana grup fosforylowych na tiofosforylowe w wiązaniach internukleotydowych generuje w strukturze oligonukleotydu dodatkowe centra chiralności, których konfiguracja ma również istotny wpływ na trwałość tworzonych dupleksów. Pierwsza metoda umożliwiająca stereoselektywną syntezę diastereomerycznie czystych PS-oligo o zdefiniowanej konfiguracji centrów fosforowych, znana dzisiaj jako metoda oxatiafosfolanowa, została opracowana w połowie lat 90-tych ubiegłego wieku w Zakładzie CBMiM PAN, w Zespole kierowanym przez prof. W. J. Steca.

Zakres tematyczny pracy doktorskiej mgr Ewy Radzikowskiej mieścił się w tym ważnym nurcie badań Zakładu. W jednej części objął on opracowanie warunków dla wykorzystania metody oksatiafosfolanowej do stereoselektywnej syntezy oligonukleotydów chimerycznych PO/PS-oligo zawierających stereozdefiniowane wiązania tiofosforanowe. Przedmiotem drugiej części pracy było opracowanie metody syntezy stereozdefiniowanych oligodeoksyrybonukleozydo( $N3'$ - $P5'$ )tiofosforanów, również na bazie metody oksatiafosfolanowej. Realizacja tej części pracy stanowiła jednocześnie zasadniczy fragment projektu realizowanego w Zakładzie w ramach umowy z amerykańską firmą Geron.

W celu adaptacji metody oksatiafosfolanowej dla celów stereoselektywnej syntezy NPS-oligo Doktorantka opracowała syntezę monomerycznych pochodnych oksatiafosfolanowych wszystkich czterech 3'-amino-2',3'-dideoxyrybonukleozydów zawierających różne podstawniki w poz. 4,4 reszty oksatiafosfolanowej oraz przeprowadziła próby ich chromatograficznego rozdzielenia na pojedyncze diastereoizomery w każdym z przypadków. Kilka udało się rozdzielić i wykorzystać następnie do zaplanowanej stereokontrolowanej syntezy oligodeoksyrybonukleozydo(*N3'*-*P5'*)amidotiofosforanów metodą oksatiafosfolanową. W modelowej reakcji, przemysłane zastosowanie (poza używanym DBU) dodatku "zewnątrznej" aminy (najkorzystniej trietyloaminy) w reakcji takiego monomeru z nukleozydem przyłączonym do złoza pozwoliło na otrzymanie tetrameru ze średnią wydajnością etapową 88%. Doktorantka zbadała następnie wpływ podstawników w pierścieniu oksatiafosfolanowym na efektywność kondensacji a także zbadała jej stereospecyficzność, chociaż bez możliwości ustalenia konfiguracji absolutnych centrów fosforowych. W opracowanych w ten sposób warunkach otrzymała serię 17 di- i trinukleozydo(*N3'*-*P5'*)amidotiofosforanów z wysokimi wydajnościami w większości przypadków. Próba otrzymania w ten sposób 10-meru zakończyła się jednak niepowodzeniem. Podobnie, najistotniejsza w tej części badań próba aplikacji tego podejścia do syntezy *stereozdefiniowanego* oligomeru GRN163, rozpoznanego inhibitora telomerazy ludzkiej, również nie doprowadziła do wydzielenia pożądanego materiału. Próba ta przyniosła jednak pewne obserwacje, które będzie można wykorzystać w kolejnych podejściach.

Jako alternatywne podejście Doktorantka sprawdziła możliwość syntezy oligodeoksyrybonukleozydo(*N3'*-*P5'*)amidotiofosforanów z wykorzystaniem wewnątrzcząsteczkowej katalizy z udziałem estrowej grupy 4-metoksy-1-oksydo-2-pikolilowej w ugrupowaniu tiofosforanowym. Ten obszerny fragment pracy wymagał najpierw syntezy odpowiednich monomerów oraz optymalizacji odczynnika kondensującego. Następnie, podjęte zostały modelowe próby syntezy oligonukleotydów zarówno w kierunku 3'-5' jak i w kierunku 5'-3' z użyciem nośnika stałego. W tym drugim przypadku Doktorantka otrzymała modelowy tetramer ze średnią wydajnością etapową 82%. Otrzymana w następnej kolejności seria 5 dinukleozydo(*N3'*-*P5'*)amidotiofosforanów wydzielona została z wydajnościami 48-75% i rozdzielona na pojedyncze P-epimery na żelu krzemionkowym.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka rozszerzyła swoje poszukiwania syntetyczne na opracowanie warunków syntezy stereozdefiniowanych chimerycznych PO/PS-oligonukleotydów z wykorzystaniem metody łączącej wprowadzanie jednostek PO metodą amidofosforynową i jednostek PS metodą oksatiafosfolanową w połączonej sekwencji sukcesywnych kondensacji. Wcześniejsze próby wykorzystania takiego połączenia obu metod w jeden proces syntetyczny okazały się nieskuteczne ze względu na niepożądane utlenianie centrów tiofosforanowych podczas niezbędnego utleniania centrów P<sup>III</sup> tworzących się w krokach amidofosforynowych. Problem ten Doktorantka bardzo korzystnie rozwiązała poprzez zastosowanie nadtlenu *tert*-

butylotrimetylosililowego jako chemoselektywnego utleniacza. Zademonstrowała następnie efektywność tak opracowanej połączonej metody amidofosforynowo-oksatiafosfolanowej do syntezy chimerycznych oligonukleotydów o założonej pozycji internukleotydowych wiązań PO i PS oraz zdefiniowanej konfiguracji centrów PS. Otrzymała w ten sposób 20 oligonukleotydów od tetramerów to tetradekamerów zawierających różne udziały wiązań fosforanowych i tiofosforanowych w założonych miejscach łańcucha. Na tym etapie badań ważnym osiągnięciem Doktorantki było też opracowanie chromatograficznego rozdzielania P-epimerycznych monomerów okstiafosfolanowych na zwykłym żelu krzemionkowym co znakomicie ułatwiło i przyspieszyło prace. Sprawdzenie czy wykorzystanie nadtlenu *tert*-butylotrimetylosililowego jako chemoselektywnego utleniacza umożliwi syntezę chimerycznych PO/NPS oligonukleotydów taką połączoną metodą. Przeprowadzone rozpoznanie przyniosło obiecujące, choć na tym etapie jeszcze nie w pełni konkluzywne efekty.

Należy w tym miejscu stwierdzić, że Doktorantka podjęła się wyjątkowo ambitnego zadania badawczego i uważam, że zrealizowała go pomyślnie, nawet jeśli nie wszystkie syntezы zakończyły się pełnym preparatywnym sukcesem. Uzyskane wyniki są wartościowe i na tym etapie wnoszą swój znaczący wkład do rozwoju stereoselektywnej syntezy modyfikowanych oligonukleotydów. Nie mam też uwag krytycznych dotyczących zarówno samego planowania eksperymentów, jak i sposobu ich przeprowadzenia, wydzielania produktów i ustalania ich struktury czy oceny stereospecyficzności kondensacji. Doktorantka wykorzystwała stosownie niezbędny zestaw nowoczesnych metod spektralnych tj. spektrometria UV,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{31}\text{P}$  NMR, MS FAB i Maldi-MS. Dyskusja wyników jest rzeczowa i prowadzi wprost do uzasadnionych konkluzji czy przypisań.

Przedstawiona do oceny dysertacja ma układ klasyczny. Jest bardzo dobrze napisana dojrzałym profesjonalnym językiem i jest zilustrowana wszystkimi niezbędnymi schematami i widmami uzyskiwanych produktów. Prezentację wyników badań własnych (66 stron) poprzedza obszernie 53-stronicowe wprowadzenie w którym Doktorantka przedstawiła w sposób przystępny ogólne mechanizmy działania i metody syntezy oligonukleotydów antysensowych. Ten rozdział również czyta się z przyjemnością i stanowi on rzeczywiście bardzo pomocne wprowadzenie w syntetyczną problematykę dysertacji. Część doświadczalna (34 strony) jest przedstawiona podobnie skrupulatnie i zawiera dostatecznie szczegółowe dane eksperymentalne i pełną dokumentację spektralną. W opisie dysertacji Doktorantka posiłkowała się 110 cytowaniami literaturowymi umieszczonymi na końcu pracy, ale także i u dołu stron pod bieżącym tekstem, co znakomicie ułatwiało czytanie. Dziękuję.

Jako nie tylko zaciekawiony czytelnik ale też i pełniący rolę recenzenta czuję się w obowiązku zwrócić uwagę na używane żargonowe określenia czy skróty myślowe, które w naukowym tekście są niepoprawne. W odniesieniu do całej pracy: niepoprawne jest używanie 'własności' zamiast 'właściwości'; używanie semantycznie niepoprawnego 'chiralny atom fosforu' zamiast 'chiralne centrum fosforowe' czy 'P-

chiralne' zamiast 'P-stereogenne'; używanie nieprecyzyjnego 'P-diastereoizomery' w miejsce jednoznacznego 'P-epimery'; stosowanie w nazwach przestarzałych kwantyfikatorów 'trój-' zamiast 'tri' np. trójetyloamina czy trójkoordynacyjny atom fosforu. W części eksperymentalnej nie sprzyja też czytaniu niepoprawny brak odstępów pomiędzy liczbami i jednostkami np. 12g zamiast 12 g , czy 10ml zamiast 10 mL i tym podobne 4mmole, 7.5 $\mu$ l ....

Nie muszę chyba dodawać, że wymienione wyżej uwagi mają charakter korekcyjny i w żadnym stopniu nie kwestionują mojej wysokiej oceny dla rangi naukowej pracy doktorskiej mgr Ewy Radzikowskiej jak też wysokiego poziomu jej realizacji i opisu, świadczących o doktorskich kwalifikacjach Kandydatki. Ponadto, część zaprezentowanych w rozprawie wyników badań została już opublikowana w formie jednego zgłoszenia patentowego i jednego artykułu wysłanego do *Organic & Biomolecular Chemistry*. Można więc stwierdzić, że zarówno sama dysertacja, jej opublikowane fragmenty, a także warte napomknienia współautorstwo 3 publikacji oryginalnych oraz 3 artykułów w *Wiadomościach Chemicznych* poza dysertacją, z całą pewnością mogą stanowić wystarczającą podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych. Z pełnym przekonaniem wnioskuję więc o dopuszczenie mgr Ewy Radzikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.