

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA**  
**INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ**

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,

tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

**Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wierzbickiej

Magister Magdalena Wierzbicka swoją pracę doktorską zatytułowaną „Synteza peptydów cyklicznych w wyniku przeniesienia acylu z atomu azotu na atom siarki oraz wewnątrzcząsteczkowej natywnej chemicznej ligacji” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zespole Inżynierii Peptydów pod opieką prof. dr hab. Piotra Stefanowicza oraz dr Mateusza Waliczka pełniącego funkcję promotora pomocniczego.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy natywnej ligacji chemicznej (NCL) i jej wykorzystania w syntezie cyklicznych peptydów. NCL pozwala na chemoselektywne łączenia fragmentów peptydowych, przy czym łączenie fragmentów peptydowych oparte jest na finalnym przeniesieniu reszty acylowej  $S \rightarrow N$ , co finalnie prowadzi do tworzenia natywnego wiązania peptydowego. Istotne jest, że w odpowiednich warunkach uzyskane białko/polipeptyd może ulegać fałdowaniu dając oczekiwany produkt o właściwej strukturze trzeciorzędowej. Pierwszy etap NCL obejmuje atak nukleofilowej grupy tiolowej reszty cysteiny na N-końcu jednego z peptydów na elektrofilowy atom węgla grupy tioestrowej na C-końcu drugiego peptydu. Jako, że jest to reakcja transtioestryfikacji i w jej wyniku powstaje produkt tioester zawierający wolną grupę aminową możliwy jest wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy wolnej pary elektronowej atomu azotu z grupy aminowej na karbonylowy atom węgla tioestru i przeniesienie acylu  $S \rightarrow N$ .

Praca posiada wielopoziomą strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej profesora Piotra Stefanowicza.

Opracowanie nowej metody syntezy peptydów cyklicznych z zastosowaniem przeniesienia reszty acylowej z atomu azotu na atom siarki i wewnątrzcząsteczkowej natywnej ligacji z jednoczesnym uwolnieniem peptydu z nośnika stałego wymagało realizacji badań wielopoziomowych, dlatego też główny cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych obejmujących: 1) opracowanie syntezy kryptotioestru wywodzącego się z N-2[tioetylo]glicyny, który byłby użyteczny w syntezie tioestrów w warunkach syntezy na fazie stałej; 2) optymalizację przyłączania kryptotioestru do nośnika

stałego oraz sprawdzenie aplikacyjności zaprojektowanego kryptotioestru w syntezie peptydów o zróżnicowanej strukturze C-terminalnego aminokwasu; 3) zbadanie szybkości migracji acylu oraz reakcji transtioestryfikacji z użyciem kryptotioestru wywodzącego się z N-2[tioetylo]glicyny oraz N-2[dimetylotioetylo]glicyny; 4) przeprowadzenia ligacji modelowych peptydów liniowych, co pozwoliło na opracowanie warunków wewnątrzcząsteczkowej ligacji prowadzącej do tworzenia cyklicznych peptydów; 5) sprawdzenie możliwości zastosowania selenocysteiny i analogów cysteiny w wewnątrzcząsteczkowej NCL z użyciem N-2[tioetylo]glicyny; 6) przeprowadzenie desulfuryzacji i deselenizacji otrzymanych cyklicznych peptydów celem potwierdzenia uniwersalności opracowanej metody w syntezie peptydów niezawierających cysteiny.

Recenzowana praca liczy 233 strony. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje streszczenie, wykaz skrótów i oznaczeń wraz z tabelami aminokwasów, nośników stałych, grup blokujących i odczynników stosowanych w syntezie peptydów, przegląd literaturowy, cel pracy, wyniki i dyskusje, wnioski, część eksperymentalną, osiągnięcia i dorobek naukowy Doktorantki, aneks i spis literatury cytowanej.

Rozdział pierwszy „Streszczenie” przedstawia w zwięzły sposób zakres zrealizowanych prac badawczych. W moim odczuciu zbędny w tym miejscu jest rysunek przedstawiający rozwój prekursorów tioestrów peptydowych opartych na reakcji przeniesienia reszty acylowej z atomu azotu na atom siarki.

Rozdział trzeci „Wykaz skrótów i oznaczeń” został podzielony na spis skrótów oraz zbiór tabel. W wykazie skrótów Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów (nazwa systematyczna COMU ma niewłaściwie rozmieszczone nawiasy, w skrótce Mob pozostał fragment anglojęzyczny). Zbiór tabel ze wzorami jest użyteczny z punktu widzenia czytającego, jednak w moim przekonaniu wzory strukturalne naturalnych aminokwasów są zbędne.

Rozdział czwarty „Przegląd literaturowy” obejmuje podrozdziały dotyczące: cyklicznych peptydów, w tym zastosowaniu cyklopeptydów w projektowaniu nowych leków peptydowych, metod syntezy peptydów (w moim przekonaniu podrozdział ten jest zbędny, gdyż przedstawia on powszechnie znane informacje dotyczące SPPS), strategii cyklizacji peptydów, ligacji chemicznej, zastosowaniu nienaturalnych aminokwasów siarkowych, selenocysteiny oraz histydyny w NCL. Ostatni podrozdział części literaturowej przedstawia zastosowanie tandmowej spektrometrii mas w analizie cyklicznych peptydów. Rozdział ten liczy 55 stron i zawiera aż 272 odnośniki literaturowe. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność

narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Doktorantce niestety nie udało się uniknąć błędów językowych, edytorskich oraz żargonu. Przykładowo: zszywanie peptydów, wolna kinetyka reakcji, szybka kinetyka reakcji, funkcjonalności boczne, „peptyd zawierający N-końcową grupę hydroksylową” powinno raczej być peptyd, w którym N-końcowy aminokwas zawiera w łańcuchu bocznym grupę hydroksylowa (strona 50), czy też „aminowanie redukcyjne”, gdzie wszystkie podręczniki mówią o redukcyjnym aminowaniu.

Rozdział piąty przedstawia cel pracy oraz bardzo drobiazgowo zestawienie celów szczegółowych. Z uwagi na wielowątkowość recenzowanej pracy, schematyczne i/lub graficzne przedstawienie celu znacznie ułatwiłoby czytanie pracy.

Najbardziej rozbudowaną częścią pracy jest rozdział szósty „Wyniki i Dyskusja”. Badania własne Doktorantka rozpoczęła od opracowania metody syntezy nowych prekursorów tioestrów: N-2[tioetylo]glicyny oraz N-2[dimetylotioetylo]glicyny. Opracowana metoda na fazie stałej polegała na reakcji kwasu chloro- lub bromooctowego z blokowanymi pochodnymi cysteamin. Doktorantka wykazała, że reakcja blokowania grupy tiolowej wydajniej zachodzi z trifentlometanolem niż chlorkiem trytylu. Jako nośniki stałe zastosowane zostały żywica TentaGel RAM, TentaGel MB NH<sub>2</sub>, TentaGel HL NH<sub>2</sub>, TentaGel S NH<sub>2</sub> oraz TentaGel NH<sub>2</sub>. W opracowanej metodzie, Doktorantka zastosowała podejście, w którym kwas halogenooctowy był odseparowany od nośnika stałego poprzez łącznik AAM. W kolejnym etapie Doktorantka sprawdziła, czy opracowany prekursor tioestru, tj. N-2[tioetylo]glicyna, osadzony na nośniku stałym może być zastosowany do syntezy peptydów w warunkach SPPS. Na tym etapie konieczne było przetestowanie różnorodnych odczynników kondensujących (PyAOP, DIC z Oxymą). Najniższe wydajności reakcji przyłączania kolejnego aminokwasu Doktorantka napotkała dla aminokwasów z rozbudowanymi przestrzennie grupami ochronnymi (Pbf, Trt, OtBu). Ponadto wbudowanie Fmoc-Ile-OH oraz Fmoc-Asn(Trt)-OH wymagało zastosowanie reakcji wspomagananej promieniowaniem mikrofalowym.

Kolejna część badań dotyczyła sprawdzenia, czy opracowany prekursor tioestru może być substratem w reakcji migracji reszty acylowej z atomu azotu na atom siarki oraz reakcji transtioestryfikacji. Okazało się, że w standardowych warunkach, reakcja zachodzi bardzo wolno, w porównaniu do opisanego w literaturze kryptotioestru N-hydroksybenzyllocysteinowego lub metody hydrazydowej. W związku z tym, po wykonaniu licznych reakcji optymalizacyjnych Doktorantka zaproponowała stosowanie procedury

dwuetapowej, w której w pierwszym etapie prowadzony jest proces migracji acylu i transtioestryfikacji z 2-merkaptoetanosulfonianem sodu (MESNa) w środowisku kwaśnym oraz ligacja w środowisku lekko zasadowym. Użyteczność opracowanej metody Doktorantka sprawdziła stosując bibliotekę peptydową Ac-LYRAX-N-SEtGly-AAM-TentaGel. Prekursory tioestrów poddawano transestryfikacji z MESNa i następczej ligacji z peptydami modelowymi zawierającymi resztę cysteiny w pozycji N-terminalnej. Produktów ligacji nie udało się Doktorantce zidentyfikować gdy X stanowiły: izoleucyna, walina, prolina oraz asparagina. Doktorantka zastosowała również wspomaganie mikrofalami, co pozwoliło jej na skrócenie czasu reakcji. W warunkach wspomagania mikrofalami Doktorantka z sukcesem przeprowadziła pośrednią ligację pomiędzy dwoma peptydylożywicami w obecności MESNa i imidazolu. **Bez wątpienia jest to nowy, zasługujący na dogłębne zbadanie, sposób ligacji peptydów.** Doktorantka sprawdziła również możliwość zastosowania opracowanego przez nią prekursora tioestru peptydowego w ligacji sekwencyjnej. Wykazała, że prekursor może być zastosowany jako środkowy fragment (segment) ligacji, pod warunkiem, że nie można stosować pochodnej tiazolidyny jako blokowanej reszty N-terminalnej cysteiny, gdyż w opracowanych warunkach dochodzi do deprotekcji i cyklizacji segmentu centralnego. Uzyskane wyniki wskazują, że rozwiązanie to powinno być bardziej użyteczne w reakcjach cyklizacji niż ligacji. Doktorantka zaproponowała stosowanie Fmoc-blokowanych centralnych fragmentów do ligacji sekwencyjnej.

Ostatnim etapem prac badawczych było sprawdzenie, czy N-2[tioetylo]glicyna będąca prekursorem tioestrów może być zastosowana w syntezie cyklicznych peptydów na drodze natywnej ligacji chemicznej. Zidentyfikowane we wstępnej fazie badań produkty uboczne takie jak cykliczne peptydy ze skróconym łańcuchem peptydowym, zhydrolizowane tioestry oraz cyklodimery, udało się wyeliminować lub znacząco zmniejszyć ich zawartość po przeprowadzeniu prac optymalizacyjnych. Na tym etapie Doktorantka zastosowała również aminokwasy o konfiguracji D jak też analogii cysteiny (selenocysteina, homocysteina, penicylamina). Opracowaną metodę Doktorantka zastosowała w syntezie naturalnych cyklopeptydów takich jak: inhibitor trypsyny z nasion słonecznika SFTI-1 oraz analog [D-Thr<sup>1</sup>Cys<sup>5</sup>]-Aksinelliny A.

Również w tym rozdziale Doktorantce nie udało się uniknąć błędów edytorskich, np. FmAa, raczej powinno być FmocAaa, zastosowanie skrótu Z dla aminokwasu (strona 90, Z raczej kojarzy się z grupą ochronną benzyloksykarbonylową), ilość miejsc znaczących po przecinku (Tabela 11, wydajność 47,393%, gdzie dla niskich wydajności podawane były tylko 2 miejsca po przecinku), Argon pisany z dużej litery (strona 93), strona 123

Doktorantka pisze „wzrost pH do wartości ponad 14”, Rysunek 88, powinien zawierać struktury przykładowych X, w przedstawionej postaci nie widać zróżnicowania strukturalnego biblioteki i jedyna różnica to kolor wypełnienia w ramce. Dla części rysunków problematyczna jest ich jakość (np. rysunki 104, 113, 114, 115, 119).

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne w żaden sposób nie obniżają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy.

Lektura tej części pracy nasunęła mi kilka pytań/uwag, które chciałabym aby Doktorantka przedyskutowała w trakcie publicznej obrony pracy:

- 1) Czym może być spowodowany brak końcowego produktu, lub niższa wydajność reakcji blokowania cysteaminy w DCM oraz MeCN?
- 2) Z czego wynikają tak duże różnice wydajności dobudowywania kolejnej reszty aminokwasowej do peptydylożywicy z blokowaną N-S-EtGly lub N-S-dmEtGly (Tabela 13)?
- 3) Proszę o przedstawienie propozycji mechanizmu tworzenia adduktów z MeCN oraz MeCN i AcOH (strona 147)
- 4) Proszę o przybliżenie metody wyznaczenia potencjału agregacyjnego (Aneks 25).

Rozdział siódmy „Wnioski” powinien być raczej zatytułowany Podsumowanie, gdyż w moim odczuciu, wnioski powinny mieć bardziej syntetyczne.

Rozdział ósmy „Część eksperymentalna” opisany jest poprawnie. Procedury i protokoły przedstawione zostały w sposób umożliwiający ich odtworzenie. W kilku miejscach pojawiają się niedociągnięcia, które jednak nie umniejszają pozytywnej oceny pracy.

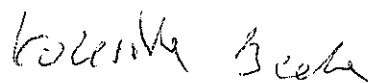
Bez wątplenia imponujący jest zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmujący 284 pozycje.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr Magdaleny Wierzbickiej składa się 8 publikacji, z czego 7 w czasopismach z listy JCR. Dwie publikacje bezpośrednio związane są z rozprawą doktorską. W publikacji w *J. Org. Chem.* Doktorantka jest pierwszym współautorem, i to właśnie ta praca stanowi podstawową część recenzowanej rozprawy. Pani Magdalena Wierzbicka jest również współautorem pięciu komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych. Doktorantka brała również kierownikiem grantu Preludium 19 oraz brała udział w realizacji projektu Opus 10, kierowanego przez Prof. Piotra Stefanowicza.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Magdaleny Wierzbickiej. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny Wierzbickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 25 11 2022