



Wroclaw, 21. 10. 2019

Prof. dr hab. inż. Artur Mucha  
Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wroclaw  
Tel.: (71) 320 34 46, 33 54, fax: (71) 320 24 27  
E-mail: [artur.mucha@pwr.edu.pl](mailto:artur.mucha@pwr.edu.pl)

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anety Kosińskiej  
*Synteza i zastosowanie nowych cząsteczek zawierających fragmenty metalokarbonylowe  
oraz grupy fosforoorganiczne lub nanocząstki magnetyczne*  
wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Bogny Rudolf, prof. UŁ  
w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Związki o małej masie cząsteczkowej stanowią przeważającą większość leków stosowanych obecnie w terapii, w tym np. w chemioterapii chorób nowotworowych. Związki takie łatwo przemieszczają się w organizmie, są zwykle rozpuszczalne w wodzie a jednocześnie przenikają przez podwójną warstwę lipidową do wnętrza komórek. To, co jest zaletą w przypadku transportu i dystrybucji leku, odwraca się na niekorzyść w kwestii szybkiego ich usuwania – detoksykacji i zbyt szerokiej biodystrybucji – małej selektywności działania. Związki wpływają zarówno na komórki nowotworowe, jak i zdrowe, powodując silnie niekorzystne skutki uboczne terapii. Wyzwaniem pozostaje nadal docelowe dostarczenie leku w dużym stężeniu przy jednoczesnej redukcji toksyczności ogólnoustrojowej. Metodą uniknięcia opisanych ograniczeń jest tworzenie koniugatów o ulepszonych właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, takich jak układy hybrydowe lek-lek czy bardzo popularne ostatnio inteligentne systemy dostarczania nośnik-lek. Nośnikami w tych ostatnich układach są związki makrocząsteczkowe, tj. polimery naturalne lub syntetyczne, np. białka, w tym szczególnie selektywne przeciwciała, a także nanocząstki. Nośniki takie jak emulsje i liposomy mogą także oferować wiązanie fizyczne, a nie kowalencyjne.

Przedmiot przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr A. Kosińskiej obejmuje właśnie tematykę syntezy nowych koniugatów i zbadanie ich aktywności biologicznej. Zgodnie ze sformułowaniem zawartym w tytule, do syntezy wybrane zostały kombinacje związków metaloorganicznych z aminofosfonianami oraz nanostrukturami magnetycznymi. Podstawową metodą ligacji chemicznej dwóch fragmentów była reakcja nukleofilowej addycji aza-Michaela grupy aminowej składnika nukleofilowego do cząsteczki maleimidu skoordynowanego z jonem metalu.

Rozprawa doktorska mgr A. Kosińskiej liczy 217 stron i została przygotowana w formie jednolitego manuskryptu. Główną treść pracy poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim. Zawartość została podzielona w sposób klasyczny dla prac eksperymentalnych i obejmuje trzy podstawowe rozdziały: przegląd literaturowy, badania własne (poprzedzone sformułowaniem celu pracy, a zakończone podsumowaniem i wnioskami) oraz część eksperymentalną. Na końcu rozprawy umieszczone zostały: wykaz używanych skrótów, wykaz referencji literaturowych (212 cytowań, z których część odnosi się do więcej niż jednej pozycji źródłowej) oraz formalny dorobek naukowy Autorki. Strona edytorska i graficzna przygotowanego dokumentu charakteryzuje się dużą starannością.

Wprowadzeniem do badań własnych jest około 45-ciostronicowy przegląd literaturowy obejmujący większość odniesień bibliograficznych ilustrujących dysertację (186 z 212 cytowań). Materiał podzielony jest na trzy wątki tematyczne zgodnie z klasami związków, którymi zajmowała się Doktorantka. W kolejności jest to: charakterystyka związków metalokarbonylowych, wybrane informacje dotyczące połączeń fosforoorganicznych, w szczególności fosfonianów, a także krótki opis dotyczący nanocząstek magnetycznych. Dwa pierwsze podrozdziały, oprócz aspektów chemicznych, zawierają wybrane dane literaturowe na temat aktywności biologicznej związków. Każdy fragment skonstruowany jest w podobny sposób: rozpoczyna się od informacji ogólnych, wręcz podręcznikowych, przechodząc następnie do specjalistycznych informacji z aktualnych publikacji źródłowych. Pozwala to czytelnikowi nawet niebędącemu specjalistą w danej dziedzinie na dobre zapoznanie się z tematem. W ten sposób Doktorantka przekazała też informacje niezbędne do prawidłowego poruszania się tematyce w badaniach własnych i interpretacji zwartych tam wyników. Jednocześnie jest to bardzo obszerny zakres materiału i z powodu oczywistych ograniczeń Autorka dokonała arbitralnego wyboru informacji do zaprezentowania. Recenzent osobiście bardziej skłania się ku węższemu, bardziej wyspecjalizowanemu, a przez to wyczerpującym analizom. Biorąc jednak pod uwagę kryterium komplementarności treści studiów literaturowych i badań własnych, wybór Doktorantki nie budzi zastrzeżeń. Ta część rozprawy zredagowana jest poprawnym i płynnym językiem, liczba potknięć gramatycznych, przekłamań typograficznych (przykłady: „burylocholinoesteraza”, str. 13, „kwasu fosforanowego(V)”, str. 37, „pirofosforowego”, str. 51) czy skrótów myślowych („Chlorochina jako jeden ze stosowanych leków przeciwmalarycznych, podlega zjawisku oporności”, str. 22) jest niewielka i nie zaburza odbioru treści. Niefortunnym uproszczeniem jest natomiast stwierdzenie, że „Fosfonianami nazywamy pięciowiązalne związki fosforu, gdzie wyróżniamy trzy zasadnicze typy połączeń: kwasy fosfonowe ... , kwasy fosfinowe ... , oraz tlenki fosfin”, str. 36. Na rysunku 1.17 przedstawiono natomiast dipeptyd fosfinowy, a nie fosfonowy. Podsumowując ten rozdział stwierdzam, że doktorantka dokonała właściwego wyboru materiału źródłowego i dobrze zarysowała podstawy tematyki badawczej, a liczba referencji oraz ich aktualność wskazują na odczytanie w bieżącej literaturze.

Tematyka badań własnych podjętych przez Doktorantkę wpisuje się w wieloletnie zainteresowania zespołu badawczego kierowanego przez Panią dr hab. Bognę Rudolf. W poprzednich latach w wyniku addycji fosfa-Michaela związków P-H (fosforynów dialkylowych oraz diarylowych) do liganda maleimidato otrzymano m.in. kompleksy

metalo-karbonylowe zawierające fragmenty fosforoorganiczne, a produkty wykazały interesującą aktywność względem cholinesteraz. Związki zaplanowane w ramach niniejszej rozprawy znacznie rozszerzają możliwości modyfikacji strukturalnych tej klasy produktów. Reakcja aza-Michaela daje szansę wprowadzenia do struktury docelowych koniugatów bardziej złożonych cząsteczek aminofosfonianów, które same często wykazują interesującą bioaktywność. Z tego względu cel pracy należy uznać za ambitne i prawidłowo sformułowane zamierzenie naukowe. Przystępując do jego realizacji Autorka otrzymała odpowiednie substraty metalo-karbonylowe oraz wybrane pochodne estrów aminokwasów fosfonowych jako substraty (a nie „substraty wyjściowe”, str. 70, 74, 77 itd.). Niestety, addycja aza-Michaela tylko w jednym przypadku przyniosła oczekiwany wynik: z niewielką wydajnością otrzymano oczekiwany kompleks w przypadku estru etylowego fosfonowego analogu glicyny. Według Autorki na niepowodzeniu zaważyły głównie przeszkody steryczne. Ponieważ reakcja odbywała się w warunkach lekko zasadowych rozważyłbym również inne możliwości przemian ubocznych  $\alpha$ -aminofosfonianów, takie jak reakcja retro-Kabaczniaka czy monohydroлиза estrów. Proszę Doktorantkę o wskazanie, na ile złożona była mieszanina poreakcyjna i jakie sygnały (o jakich przesunięciach chemicznych) obserwowano dla mieszaniny niepoddanej przeróbce, a także proszę o ewentualną dyskusję.

Słusznie uznając swoje pierwsze wybory za niefortunne, Doktorantka zdecydowała się na homologiczne  $\omega$ -aminoalkilofosfoniany jako substraty alternatywne. Także w tym przypadku nie udało się ominąć trudności a wyniki addycji ponownie były dalekie od oczekiwań, co wytłumaczono możliwością tworzenia cyklicznych fosfonamidów. Trudno przedstawić alternatywną przyczynę dla tej propozycji, choć zgodnie z danymi literaturowymi potrzeba znacznie mocniejszej zasady w celu przeprowadzenia podobnej wewnątrzcząsteczkowej substytucji na atomie fosforu, poza tym powstawanie pierścieni np. ósmiocłonowych, nie jest raczej uprzywilejowane.

Skutecznym wyjściem okazało się natomiast użycie *o*-, *m*- i *p*-(aminometylo)-benzylofosfonianów. Związki te otrzymano z odpowiednich dibromopochodnych poddając je kolejnym substytucjom: z ftalimidkiem potasu oraz reakcji Arbuzowa. Sekwencję syntetyczną kończyła hydrazynoliza. W analogiczny sposób otrzymano pochodne bisfosfonowe używając anionu metylenobisfosfonianu tetraetylu, zamiast fosforynu trialkilowego, jako nukleofila w drugim etapie substytucji. Takie podstawione benzyloaminy ulegały oczekiwanej addycji do liganda maleimidato i pozwoliły na otrzymanie oraz scharakteryzowanie docelowych kompleksów metalo-karbonylowych. Zsyntetyzowane koniugaty fosfonowe nie hamowały niestety aktywności lub okazały się bardzo słabymi inhibitorami acetylo- oraz butyrylocholinoesterazy, mimo że jeden z substratów (*o*-aminometylobenzylofosfonian dietylu) wykazał całkiem dobre powinowactwo do tego pierwszego enzymu. Zarówno związki fosfonowe, jak i bisfosfonowe, nie wykazywały cytotoksyczności charakterystycznej dla wyjściowych kompleksów żelaza i rutenu.

Mimo braku spektakularnych wyników badań biologicznych tą część pracy oceniam wysoko. Autorka w sposób rzetelny przedstawiła problemy syntetyka organika poruszającego się na niepewnym gruncie, który chemia fosforoorganiczna często przygotowuje kolejnym eksploratorom. Grupa pochodnych, a nawet pojedyncze związki potrafią zachowywać się

w sposób indywidualny i nietypowy. A niechęć do tworzenia monokryształów, które można poddać analizie rentgenowskiej, to tylko jeden z mniej uciążliwych przejawów. Autorka poradziła sobie z tym całkiem dobrze otrzymując nowe zaawansowane strukturalnie połączenia. To, że nie wykazały one aktywności, trudno było przewidzieć, chociaż miałbym w tej kwestii pewne propozycje dotyczące kontynuacji badań. Przede wszystkim, fosfonowe estry alkilowe są akurat mniej użyteczne w tego typu zastosowaniach niż wolne kwasy (szczególnie bisfosfonowe), czy estry aryłowe (znane inhibitory proteaz serynowych, w tym stanowiących cele terapii przeciwnowotworowej, takich jak np. urokinazowy aktywator plazminogenu). W związku z tym proszę o odpowiedź na pytanie, czy były podejmowane próby hydrolizy/dealkilowania estrów alkilowych końcowych związków do wolnych kwasów. Czy były podejmowane próby otrzymania estrów difenylowych aminofosfonianów w addycji aza-Michaela.

Bardzo cenne są fragmenty pracy będące dygresjami do głównego wątku. Mam na myśli akapit dotyczący cykloaddycji Dielsa-Aldera badanych kompleksów z cyklopentadienem (produktem rozpadu substratu metalokarbonylowego) oraz rozdział na temat addycji oksa-Michaela. Autorka podeszła do tych nieoczekiwanych obserwacji z dużą uwagą, wydzieliła i scharakteryzowała produkty, w tym na podstawie struktur krystalicznych, a także odpowiednio rozwinęła lub wyjaśniła oba wątki. W przypadku reakcji Dielsa-Aldera dodatkowo użyła aminofosfonian zawierający fragment furanu i w ten sposób wskazała nową drogę do osiągnięcia kompleksów zawierających fragmenty fosforowe. Natomiast dla reakcji addycji alkoholi zaproponowała szczegółowy mechanizm reakcji w powiązaniu z podatnością kompleksów na fotodegradację.

Komplementarnym wątkiem badawczym rozprawy doktorskiej mgr A. Kosińskiej była immobilizacja kompleksów metalokarbonylowych na powierzchni nanocząstek magnetycznych. Powierzchnia nanocząstek została sfunkcjonalizowana tak, aby uzyskać obsadzenie reaktywnymi grupami aminowymi bądź tiolowymi. Reagowały one jako składnik nukleofilowy w addycji Michaela do sukcyimidu kompleksów dając docelowe koniugaty. Ich uzyskanie zostało potwierdzone odpowiednimi metodami analitycznymi i spektroskopowymi, a immobilizowane kompleksy okazały się bardziej odporne na fotodegradację w porównaniu do pochodnych niemodyfikowanych. Produkty wykazały również dobre właściwości przeciwbakteryjne (*Pseudomonas aeruginosa*) oraz przeciwgrzybicze (*Candida albicans*), przy czym odpowiednie kompleksy nieskoniugowane z nanocząstkami były słabo aktywne. Szkoda, że nie zostało wyraźnie stwierdzone, jak bardzo rośnie aktywność koniugatów w porównaniu do nanocząstek MNP@NH<sub>2</sub> czy MNP@SH, które powinny stanowić materiał referencyjny. Recenzent czuje się zwolniony z konieczności bardziej wnikliwej oceny tego fragmentu pracy, ponieważ został on opublikowany w bardzo dobrym czasopiśmie *Applied Surface Science*, a zatem został poddany surowym warunkom recenzji niezależnych ekspertów.

Ostatni fragment pracy dotyczy bezpośredniej koniugacji nanocząstek typu *core-shell* modyfikowanych terminalnymi grupami tiolowymi z kompleksem CpFe(CO)<sub>2</sub>I (bez użycia łącznika sukcyimidowego). Udało się zoptymalizować syntezę zgodnie z oczekiwaniami, ale w mojej opinii rozprawa mogłaby się obyć bez tych kilku ostatnich stron. Biorąc pod uwagę podobieństwo strukturalne, fragment ten jest najmniej spójny z całością pracy; badania mają

charakter raczej pilotażowy i brakuje jeszcze serii związków, które mogłyby zostać poddane testom aktywności biologicznej.

Kończąc ocenę badań własnych mgr A. Kosińskiej należy dodatkowo podkreślić, że wiele wyników zostało osiągniętych na drodze współpracy krajowej i międzynarodowej. Połączenie możliwości kilku grup badawczych niewątpliwie podniosło rangę wyników i nadało im charakter multidyscyplinarny. Jednocześnie dobrze świadczy to o mobilności Doktorantki, umiejętności operowania różnorodnymi technikami i szerokich horyzontach naukowych.

Ostatnim fragmentem rozprawy jest część eksperymentalna. W tym obszernym rozdziale (prawie 65 stron) szczegółowo opisano procedury syntetyczne i analityczne. Są one dobrze ilustrowane wzorami chemicznymi, schematami reakcji i wykresami, co ułatwia szybkie odnalezienie i zapoznanie się przepisami eksperymentalnymi. Opisy są klarowne, łatwe do zrozumieniu i powtórzenia. Otrzymanie nowych indywiduów chemicznych poparto wyczerpującą charakterystyką. Analizując opis spektroskopowy wybranych związków napotkałem jednak pewne niejasności związane z przyporządkowaniem oraz charakterystyką sygnałów. Zwracam na to uwagę w kontekście ewentualnego opublikowania wyników w przyszłości. Dla zilustrowania i wyjaśnienia wątpliwości proszę o krótką dyskusję na ten temat dla jednego wybranego przykładu – pierwszego zsyntetyzowanego kompleksu 2.12. W szczególności proszę o wyjaśnienie skąd w widmie  $^1\text{H}$  NMR bierze się ddd dla sygnału 4,15 ppm przyporządkowanemu grupom  $\text{OCH}_2$ ? Czy nie ma pomyłki w przypisaniu sygnału 3,69 ppm jednemu z protonów  $\text{N-CH}_2\text{-P}$ ? Stałe sprzężenia tego dubletu dubletów ( $J \sim 8$  Hz oraz  $J \sim 5$  Hz) są komplementarne względem sygnałów obserwowanych dla pierścienia sukcyimidu (2,84 ppm, dd oraz 2,40 ppm, dd). Czy w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR rzeczywiście nie są widoczne sprzężenia P-C dla sygnałów jąder atomów węgla grup metylenowych 62,36 (s,  $\text{OCH}_2$ ), 38,80 (s,  $\text{NH-CH}_2\text{-P}$ ). Unikałbym też nazywania sygnałów rezonansowych  $^{31}\text{P}$  NMR singletami. W rzeczywistości są one multipletami, jednak standardowo stosuje się technikę odprężania od protonów  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , co powinno zostać zaznaczone w uwagach ogólnych.

Wszystkie poczynione uwagi mają charakter formalny i nie umniejszają mojej wysoce pozytywnej opinii o rozprawie doktorskiej mgr A. Kosińskiej. Doktorantka przedłożyła obszerną, multidyscyplinarną i starannie zredagowaną dysertację. Okazała się jednocześnie dociekliwym eksperymentatorem i dążyła do pełnego opisu wyników reakcji oraz otrzymanych struktur. Wyniki badań udało się częściowo opublikować, myślę, że jest szansa na kolejne artykuły. Poziom merytoryczny pracy doktorskiej Pani mgr Anety Kosińskiej upoważnia mnie do jednoznacznego stwierdzenia, że odpowiada ona wszystkim wymogom zawartym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) i może być podstawą nadania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Tym samym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie pracy i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

