



Politechnika Wrocławska

Prof. dr hab. inż. Artur Mucha
Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
Tel.: (71) 320 34 46, fax: (71) 320 24 27
E-mail: artur.mucha@pwr.edu.pl

Wrocław, 05. 11. 2025

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej
„*Związki fosforoorganiczne jako terapeutyki i znaczniki w diagnostyce medycznej*”
wykonanej pod kierunkiem Pana dr. hab. inż. Jakuba Adamka, prof. PŚ
(promotor pomocniczy – Pani dr inż. Anna Kuźnik)
w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej

Uwagi wstępne

Podstawą sporządzenia recenzji było pismo nr RDNCh.512.6.2025 skierowane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej, Panią prof. dr hab. inż. Dorotę Neugebauer, z dnia 17 września 2025 r., dotyczące powołania mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej.

W przygotowaniu recenzji kierowałem się art. 187 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U.2024.1571). W szczególności oceniałem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także czy przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Struktura i układ pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej została wydana w formie wydruku cyfrowego liczącego 185 stron. Treść dysertacji została podzielona w sposób charakterystyczny dla prac eksperymentalnych z dziedziny nauk ścisłych na trzy podstawowe rozdziały: *Studia literaturowe*, *Omówienie wyników* oraz *Część eksperymentalna*. Rozdziały te są właściwie zrównoważone objętościowo zajmując odpowiednio: około 50-ciu, 50-ciu oraz 40-tu stron. Całość poprzedza kilkustronicowe omówienie założeń i celu pracy, a opis wyników zamyka podobnej objętości *Podsumowanie oraz wnioski*. Rozprawa zawiera odniesienia do ponad 200-tu pozycji zebranych w rozdziale *Literatura*, będących w większości cytowaniami oryginalnych i w mniejszym stopniu przeglądowych artykułów naukowych (polecam uwadze Autorki, że standardem jest obecnie podawanie referencji wraz z tytułami). Zgodnie z wymogami, rozprawa została opatrzona

streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Kandydatka do stopnia doktora przedstawiła również dorobek publikacyjny i konferencyjny. Dysertacja zawiera wykaz używanych skrótów (wyjaśnienia znajdują się także w tekście przy pierwszym użyciu), natomiast w załączniku dodatkowo zamieszczono widma NMR 1-aminometylenobisfosfonianu tetraetylu i jego pochodnych.

Stronę formalną przygotowania manuskryptu oceniam bardzo wysoko. Na szczególne uznanie zasługuje schludne opracowanie graficzne, z ponad 60-cioma schematami i 45-cioma rysunkami (nie licząc struktur w *Części Eksperymentalnej*), często bardzo rozbudowanymi, a także tabelami dobrze porządkującymi bogactwo danych, szczególnie w części literaturowej. Struktury związków chemicznych są numerowane, a do numerów grafik oraz związków Autorka konsekwentnie odnosi się w tekście. Styl narracji jest logiczny i klarowny, a język rozprawy profesjonalny, unikający potknięć stylistycznych i określeń żargonowych. Korekta została wykonana bardzo starannie a liczba błędów typograficznych czy merytorycznych (np. błędnie narysowany wzór XC, Schemat 27, str. 56 czy brak „7-aza” we nazwie HATU, str. 86) ograniczona do minimum. Nazewnictwo związków chemicznych jest zasadniczo poprawne, niemniej w ramach dyskusji w czasie publicznej obrony i dla wyjaśnienia wątpliwości samego recenzenta proszę o rozstrzygnięcie, która wersja nomenklatury niepodstawionego 1-amino-1,1-bisfosfonianu (metylideno czy metyleno), także kwasów fosfonowych (alkano czy alkilo) jest bardziej formalna. Dodatkowo przypominam, że separatorem dziesiętnym w języku polskim jest przecinek, a nie kropka.

Cel pracy został jasno sprecyzowany i uwzględnił kilka kluczowych punktów. Po pierwsze zakładał optymalizację opracowanej w macierzystym zespole metody syntetycznej dla uzyskania symetrycznie oraz niesymetrycznie podstawionych pochodnych kwasów 1-amino-1,1-bisfosforowych (fosfeno, fosfonylo, fosfenoilo), zawierających wybrane podstawniki aminokwasów proteinogennych. Po drugie, zaplanowano skoniugowanie grupy aminowej bisfosfonianów z wybranymi związkami o znanej aktywności przeciwnowotworowej lub kompleksującej jony metali dla uzyskania, odpowiednio, nowych układów bioaktywnych lub znaczników diagnostycznych. Zwieńczeniem badań miała być ocena aktywności biologicznej nowych związków, w szczególności ich cytotoksyczności. Postawiony problem badawczy tego wielowątkowego multidyscyplinarnego projektu uznaję za zdecydowanie ambitny i stanowiący oryginalne wyzwanie naukowe.

Ocena merytoryczna

Studia literaturowe rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. D. Kozickiej to rozdział wielowątkowy, który obejmuje omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat syntezy oraz zastosowania bisfosfonianów i ich pochodnych. Przedstawione zostały m.in. terapeutyczne i mechanistyczne aspekty aktywności związków, które mają udział w rynku farmaceutycznym o wartości kilku miliardów dolarów i weszły do szerokiego użycia klinicznego, głównie w leczeniu chorób kości oraz chorób nowotworowych. Szczegółowo zostały opisane wybrane metody otrzymywania bisfosfonianów, ze zwróceniem szczególnej uwagi na zasięg i ograniczenia metod syntetycznych. Na koniec przedstawiono potencjał związków w konstrukcji nowych systemów dostarczania leków oraz w diagnostyce medycznej.

Materiał merytoryczny zawarty w tej części jest bardzo bogaty, co pokazuje odczytanie i wiedzę nabytą przez Kandydatkę w tematyce doktoratu. Ta część dysertacji odnosi się aż do 174 pozycji literaturowych, co należy uznać za wyczerpujące. Dla porównania, najnowszy, kompletny, około 60-stronicowy, opublikowany praktycznie jednocześnie z ocenianą rozprawą przegląd literaturowy prof. Ordoñez, dotyczący syntezy i aktywności biologicznej bisfosfonianów w ostatnich 15-tu latach, uwzględnia niecałe 150 referencji (*Pharmaceuticals* **2025**, 18, 1063). Całość jest przemyślana – zachowana jest zwięzłość i płynność narracji, a uniknięta maniera nużącego wymieniania luźno powiązanych ze sobą informacji. Znamionuje to dojrzałą i pogłębioną wiedzę Autorki w reprezentowanej dyscyplinie, połączoną ze zdolnością do krytycznej analizy danych literaturowych.

Badania własne Doktorantki zostały rozpoczęte od syntezy 10-ciu pochodnych kwasu aminobisfosfonowego zgodnie z metodą opracowaną wcześniej. Metoda polegała na sekwencji dwóch reakcji Michaelisa-Arbuzowa, pierwszej z fosforynem dietylu, a drugiej z fosforynem trietylu w obecności Ph_3PBF_4 , wychodząc z N-acyloimidoilanu (głównie N-benzylloksykarbonylo) etylu. Doktorantka optymalizowała przebieg drugiej substytucji do wersji jednoetapowej i niewymagającej użycia diizopropylloetyloaminy. Produkty poddawane zostały hydrogenolizie katalitycznej oraz hydrolizie w warunkach kwasowych, co umożliwiło otrzymanie odpowiednich aminoesterów oraz całkowicie odblokowanych związków docelowych. Przeniesienie zasięgu metody na mieszane pochodne fosfonowo-fosfinowe (z użyciem fenylofosfoninu dietylu) oraz fosfonowo-fosfonotlenkowe (z użyciem difenylofosfininu metylu) przyniosło dobre wyniki, natomiast w przypadku trudności skuteczna była wersja dwuetapowej substytucji z wydzieleniem soli tetrafluoroboranowej. Problematiczne okazało się natomiast usunięcie grup ochronnych w mieszanych pochodnych – tylko dla jednego związku udało przeprowadzić się efektywną hydrogenolizę połączoną z dealkilowaniem grupy fosfonoestrowej.

Ten fragment badań własnych jest bardzo cenny dla czytelnika zainteresowanego chemią fosforoorganiczną. Pokazuje systematyczne opracowanie zoptymalizowanej metody syntezy związków interesujących pod kątem aktywności biologicznej. Doktorantka wykorzystuje różnorodne metody oraz techniki obserwując i komentując zależność wyników transformacji od struktury związku. Zwraca uwagę na aspekty stereochemiczne. Dla mieszanych pochodnych fosfonowo-fosfinowych, dla których stwierdzono powstawanie mieszanin diastereomerycznych, udało się rozdzielić pary enancjomerów jednego ze związków. Nie wszystkie trudności związane z deprotekcją mieszanych związków bisfosforowych udało się jednak przezwyciężyć. W tym miejscu prosiłbym o nieco szersze ustosunkowanie do napotkanych problemów. Czy ich przyczyną mogło być zatrucie katalizatora? Czy w grę może też wchodzić nietrwałość aminoestrów (w przypadku aminofosfonianów jest to znany fakt)? Czy rozważana była deprotekcja jednoetapowa – użycie bromotrimetylosilanu powinno doprowadzić do usunięcia zarówno grup etylowych, jak i benzylloksykarbonylowej? Rozstrzygnięcie tego problemu otworzyłoby drogę do pochodnych mieszanych, które uważam za najbardziej nowatorskie struktury, i użycia ich w syntezie odpowiednich koniugatów (dalszy komentarz poniżej).

Otrzymywanie koniugatów bisfosfonian-związek bioaktywny stanowi zawartość drugiego podrozdziału badań własnych Kandydatki. Użyto w nich jedynie modelowego związku – aminometylenobisfosfonianu tetraetylu. Metodologię sprzęgania jego funkcji aminowej z grupą karboksylową drugiego komponenta opracowano z użyciem pochodnych betuliny. Szczegółowo optymalizowano warunki karbodiimidowej metody aktywacji osiągając dobrą konwersję i wydajność. Co ciekawe, parametry te zostały znacznie polepszone w wersji upraszczającej skład mieszaniny reakcyjnej, tj. uwzględniającej wyeliminowanie m.in. dodatku benzotriazolu oraz metanolu jako składnika rozpuszczalnika (czy w wersji początkowej obserwowano powstawanie estru metylowego substratu karboksylowego?), a wprowadzającej indukcję ultradźwiękową i temperaturową. Pozwoliło to na uzyskanie wszystkich założonych koniugatów z wybranymi związkami bioaktywnymi, głównie o działaniu przeciwnowotworowym, a także modyfikowanych fragmentem trifenylofosfoniowym.

Ta część pracy wykazuje równie wysoki poziom merytoryczny jak poprzednia, znamionujący pracę doświadczonego chemika organika. Lokuje się na pograniczu syntezy celowanej, zmierzającej do otrzymania konkretnych złożonych związków, ale nie zaniedbuje części metodologicznej, której wyznacznikiem jest uzyskanie nowej skutecznej metody preparatywnej. Zawiera wiele cennych szczegółów eksperymentalnych dotyczących otrzymywania wiązania amidowego z nieoczywistych substratów. Żałuję jedynie, że nie użyto szerszego wyboru związków bisfosforowych. Pochodne mieszane nie przewyższają co prawda bisfosfonianu w kwestii powinowactwa do hydroksypatytu tkanki kostnej, ale być może one same oraz ich koniugaty ujawniłyby ciekawą aktywność przeciwbakteryjną czy cytotoksyczną.

Dodatkowo, w ramach sugestii w kwestii otrzymywania koniugatów proponuję rozważyć metodę acylowania persililowanych związków bisfosforowych (otrzymywanych z odblokowanych pochodnych w łagodnych warunkach (np. chlorotrimetylosilan/zasada organiczna) lub z Z-blokowanych estrów (pod wpływem bromotrimetylosilanu) aktywowanymi substratami karboksylowymi. Podejście to dobrze sprawdza się do modyfikowania grupy aminowej aminofosfonianów. Jego główną zaletą jest uzyskiwanie wolnej grupy fosfonowej w produkcie po standardowej przeróbce, a bez konieczności dodatkowego etapu deprotekcji, co przysparzało Doktorantce największych trudności.

Kolejny, najkrótszy podrozdział badań własnych opisuje próby użycia aminometylobisfosfonianu tetraetylu w celu otrzymywania koniugatu z komponentem sideroforowym. Taki konstrukt, po skompleksowaniu odpowiednich jonów metalu, miałby możliwość wykorzystania jako znacznik diagnostyczny w medycznych technikach obrazowania. Zarówno sprzęganie jak i oczyszczenie produktu nastąpiło sporych trudności związanych głównie z kwestiami słabej rozpuszczalności oraz problematyczną analizą produktu. Pomimo tego, osiągnięto docelowy ester o zadawalającej czystości, którego kompleks cyrkonowy wykazał w różnych warunkach stabilność zbliżoną do tej charakterystycznej dla wzorcowego liganda komercyjnego.

Wyniki te mają zdecydowanie wstępny charakter. Konieczne są dalsze prace, które doprowadzą do efektywnego dealkilowania estru fosfonowego koniugatu. Dopiero w takim przypadku odsłonięta funkcjonalność kwasów fosforowych doprowadziłaby do udziału w kompleksowaniu. Jest to niewątpliwie atrakcyjna naukowo perspektywa dalszych prac

w tym kierunku. W tym miejscu warto jednak wyrazić uznanie dla gotowości Doktorantki do poznawania nowych technik i podjęcia eksperymentów wykraczających poza domenę chemii organicznej.

Multidyscyplinarność zainteresowań i nabytych umiejętności Kandydatki najdobitniej manifestuje się w obszernym rozdziale zamykającym dokonania własne, a dotyczącym badań biologicznych otrzymanych związków. Badania te uwzględniły ocenę aktywności cytotoksycznej kwasów bisfosfonowych oraz koniugatów aminometylenobisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny, a także właściwości antybakteryjnych tych pierwszych związków. Najprostszy strukturalnie kwas aminometylenobisfosfonowy wykazał najwyższą aktywność względem wybranej linii komórek nowotworowych (IC₅₀ w niskim zakresie mikromolarnym), porównywalną do Zoledronianu. W odróżnieniu jednak od Zoledronianu, działał kooperatywnie w kombinacji z lekami cytotoksycznymi. Wykazał selektywność względem komórek nienowotworowej linii fibroblastów.

Wyniki aktywności kwasu aminometylobisfosfonowego mają zdecydowanie najciekawszą wymowę. Można zaryzykować stwierdzenie, że pośrednio potwierdziły one możliwości tej struktury w perspektywicznej konstrukcji nowych systemów dostarczania leków w terapiach nowotworów kości. W takich układach fragment bisfosfonianu pełniłby podwójną rolę: byłby odpowiedzialny za docelowe wiązanie i wykazywałby kooperatywną aktywność przeciwnowotworową. W ramach pracy nie udało się niestety otrzymać koniugatów zawierających wolne grupy fosfonowe, co mogłoby potwierdzić takie rozumowanie. Odpowiedni ester bisfosfonianu nie okazał się być aktywny, a sprzężony wiązaniem amidowym z pochodnymi betuliny pozwalał co najwyżej zachować charakterystyczną cytotoksyczność wzorcowej betuliny. Rozwijanie tego wątku badawczego wydaje się być oczywistą kontynuacją osiągnięć doktoratu.

Umiarkowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych kwasów bisfosfonowych względem *Staphylococcus aureus* uznałbym za dodatkową, choć mniej obiecującą wartość pracy.

Podsumowując wysoką jakość pracy doktorskiej Pani mgr inż. D. Kozickiej, stwierdzam, że zostało osiągniętych kilka kluczowych celów badawczych, które składają się na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Po pierwsze, zoptymalizowana została uniwersalna metoda syntezy związków aminometylenobisfosforowych z uwzględnieniem różnych nukleofili fosforowych. Po drugie, rozszerzony zasięg powyższej reakcji pozwolił na otrzymanie kilkudziesięciu nieopisanych dotychczas związków docelowych, symetrycznych oraz mieszanych. Po trzecie, potwierdzono możliwość koniugowania tych związków z innymi strukturami bioaktywnymi. Po czwarte, osiągnięto interesujący profil aktywności cytotoksycznej wybranych produktów. Powyższe stwierdzenia skłaniają do konkluzji, że realizując zamierzone cele Doktorantka okazała się doświadczonym badaczem posiadającym umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej o charakterze multidyscyplinarnym.

Praca doktorska tworzy określoną całość, a jednocześnie może stanowić punkt wyjścia do kontynuowania podjętych wątków badawczych. Pewne problemy pozostały nierozwiązane,

a pytania otwarte. Inspirują one do dalszej dyskusji, w tym do podjęta dyskusji na temat otwartych kwestii w trakcie publicznej obrony.

1. Czy były podejmowane (lub będą podjęte) próby koniugacji niesymetrycznych związków bisfosforowych i oznaczenia bioaktywności ich samych oraz koniugatów?
2. Czy testowano cytotoksyczność innych (niż pochodne betuliny) otrzymanych koniugatów? Jakie są plany względem otrzymanej pochodnej trifenylofosfoniowej?
3. Dane na temat mechanizmu cytotoksyczności bisfosfonianów są obecne w literaturze naukowej. Czy i w jaki sposób planowane są dalsze badania mające na celu rozstrzygnięcie addytywności/synergizmu ich działania w eksperymentach uwzględniających kombinację ze znanymi lekami.

Część eksperymentalna zamykająca pracę spełnia wysokie standardy właściwego opisu procedur syntetycznych i metod badań biologicznych. Homogeniczność związków i poprawność ich struktury zostały potwierdzone pełną charakterystyką spektroskopową (^1H , ^{13}C oraz ^{31}P NMR, a także IR) oraz wynikami spektrometrii mas (HRMS). Podana jest postać związku, wydajność, a także temperatura topnienia dla pochodnych krystalicznych. Dane te zostały w większości ujęte w opublikowanych artykułach naukowych, zatem podlegały zewnętrznej ocenie recenzenckiej.

Jak wspomniano, wyniki uzyskane w pracy doktorskiej Pani mgr inż. D. Kozickiej zostały już w dużej części opublikowane. Współautorstwo trzech prac powiązanych z doktoratem: *Molecules*, 2022, *RSC Advances*, 2023 oraz *RSC Advances*, 2025 jest najważniejszym z punktów w dorobku Doktorantki. W najświeższym artykule Kandydatka jest pierwszą autorką, w dwóch pozostałych – drugą, natomiast rolę pierwszej autorki pełni Pani promotor pomocnicza. Pozostałe osiągnięcia publikacyjne to praca przeglądowa w *Wiadomościach Chemicznych*, kilka zgłoszeń patentowych oraz artykułów w materiałach pokonferencyjnych. Biorąc pod uwagę powyższe osiągnięcia stwierdzam, że z naddatkiem spełniony jest wymóg ustawy posiadania przez Kandydatkę dorobku naukowego w postaci co najmniej jednego artykułu opublikowanego w czasopiśmie naukowym.

Konkluzja

Po zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania ujęte we właściwej ustawie i może być podstawą nadania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych. Wobec powyższego wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o przyjęcie pracy i dopuszczenie do publicznej obrony.

Jednocześnie zgłaszam rekomendację w kwestii wyróżnienia ww. pracy. Zarówno dzieło, w postaci dysertacji doktorskiej, jak i sylwetkę naukową Kandydatki, charakteryzuje wysoki poziom merytoryczny, który został dodatkowo udokumentowany opublikowaniem oryginalnych wyników w renomowanych czasopismach naukowych. W jednym z artykułów (*Ultrasound-assisted synthesis of new bisphosphonate–betulin conjugates and preliminary evaluation of their cytotoxic activity. RSC Advances, 2025, 15, 4086–4094.*) Kandydatka jest pierwszym autorem. W ten sposób wypełnione są warunki wyróżnienia ujęte w *Regulaminie w zakresie nadania stopnia doktora* Politechniki Śląskiej. Podpisano odrębnie przez autora