



UNIwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii

ZAKŁAD SYNTEZY I STRUKTURY ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

Prof. UAM dr hab. Magdalena Rapp
Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu
magdrapp@amu.edu.pl

Poznań, 14 listopada 2025 roku

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej

pt.: „Związki fosforoorganiczne jako terapeutyki i znaczniki w diagnostyce medycznej”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej pod kierunkiem Pana prof. Pol. Śl. dr. hab. inż. Jakuba Adamka oraz dr inż. Anny Kuźnik jako Promotora Pomocniczego.

Praca doktorska dotyczy syntezy pochodnych kwasów 1-amino-1,1-bisfosforowych z użyciem soli trifenylofosfoniowych czyli tematyki, w której uznanym autorytetem jest Promotor pracy. Otrzymane w ten sposób pochodne zostały następnie zastosowane w syntezie koniugatów ze związkami o znanych właściwości biologicznych celem otrzymania potencjalnych środków leczniczych lub znaczników do aplikacji w diagnostyce medycznej. Dzięki bogatej i zróżnicowanej aktywności biologicznej, którą wykazują związki fosforoorganiczne obszar badawczy związany z ich syntezą oraz zastosowaniem fascynuje wielu chemików organicznych oraz biochemików na całym świecie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy syntezy modyfikowanych symetrycznych pochodnych kwasów α -amino-gem-bisfosfonowych, ich niesymetrycznych fosfonowo-fosfoniowych oraz fosfonowo-fosfinowych odpowiedników odpowiadających takim aminokwasom jak glicynie, alaninie, leucynie, fenyloalaninie czy fenyloglicynie. Następnie, wybrana pochodna 1-amino-1,1-bisfosfonianowa została sprzęgnięta z wytypowanymi, wykazującymi aktywność biologiczną molekułami lub modyfikowana poprzez wprowadzenie lipofilowego ugrupowania trifenylofosfoniowego. Finalnie, otrzymane związki przebadano pod kątem aktywności cytotoksycznej oraz przeciwbakteryjnej. Dodatkowo, oceniono także pod kątem zastosowania jako znacznika diagnostycznego zdolność chelatacji oraz stabilność chelatu modyfikowanej aminobisfosfonianowej pochodnej deferoksaminy z radioaktywnym izotopem cyrkonu ^{89}Zr .

Część badań opisanych w recenzowanej dysertacji naukowej została wykonana dzięki współpracy z Katedrą Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii Politechniki Śląskiej w Gliwicach, przy współpracy z Zakładem Radiofarmacji i Obrazowania Laboratoryjnego PET Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach, w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej oraz w trakcie rocznego stażu badawczego w Pracowni Molekularnych Mechanizmów Terapii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach. Efektem pracy były wyniki opublikowane w formie czterech oryginalnych publikacji o zasięgu międzynarodowym z listy *Journal Citation Reports* (dwa artykuły w *RSC Advances* IF 4,6; *Molecules* IF 4,6; *MolBank* IF 0,4), trzy publikacje w wydawnictwach polskich (w tym w *Wiadomościach Chemicznych*) oraz dwa zgłoszenia patentowe. W czterech z powyżej wymienionych publikacji Doktorantka była także

pierwszą Autorką. Do całości dorobku naukowego należy też dodać trzy publikacje angielskie (*Molecules* IF 4,6; *Catalysts* IF 4,0; *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* IF 1,6)

Ocena pracy

Treść pracy odpowiada tematowi określonymu w tytule. Praca w postaci jednotomowego opracowania zawiera 185 ponumerowanych stron. Zbudowana jest następująco: zawiera sprecyzowane założenia i cel pracy (str. 8-12), starannie przygotowaną część teoretyczną (Rozdziały 1-4, str. 13-63) oraz część omawiającą wyniki (str. 64-116). Opis badań własnych zawiera cztery rozdziały odnoszące się do syntezy związków α -amino-1,1-bisfosforowych, ich dalszych zastosowań w syntezie koniugatów oraz znacznika diagnostycznego, a także ocena właściwości biologicznych otrzymanych związków. W dalszej części pracy zawarte są podsumowanie i wnioski (str. 117-121), a następnie część eksperymentalna, w której znajdują się procedury eksperymentalne oraz metodyka badań biologicznych (str. 122-163). Całość zamykają spis cytowanej literatury (str. 168-175), wyszczególniony dorobek naukowy wraz z innymi osiągnięciami (str. 176-180) oraz załączniki zawierające widma ^1H NMR, ^{13}C NMR i ^{31}P NMR wybranych związków (str. 181-185). Ponadto, w pracy można znaleźć wykaz stosowanych skrótów (str. 4-7), a także streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim (str. 164-167). Taki układ pracy pozwala właściwie, w sposób przejrzysty i logiczny zaprezentować przeprowadzone badania i uzyskane wyniki.

Część literaturowa wprowadza czytelnika w tematykę pochodnych bisfosfonianów, ich struktury, klasyfikacji oraz właściwości biologicznych, wraz ze szczególnie wnikliwym opisem ich aktywności antyresorpcyjnej i przeciwnowotworowej. W osobnym podrozdziale zawarte są informacje na temat różnego rodzaju zastosowań kombinacji zestawów bisfosfonianów z różnorodnymi cytostatykami w terapiach skojarzonych. Dalej następuje podrozdział omawiający aktywne biologicznie α -aminowe pochodne bisfosfonianów. W kolejnym rozdziale Autorka w sposób kompetentny opisała wybrane strategie stosowane w syntezie układów 1-amino-1,1-bisfosforowych, w tym pochodnych bisfosfonowych, fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych. Związki te mogą zostać wykorzystane w ukierunkowanym dostarczaniu leków, stąd następny rozdział poświęcony jest aktywności biologicznej koniugatów *gem*-bisfosfonowych ze związkami bioaktywnymi wraz ze szczególnym uwzględnieniem metod ich otrzymywania. Doktorantka dokonała także oceny właściwości funkcjonalizowanych układem bisfosfonowym ligandów oraz znaczników stosowanych w diagnozowaniu różnego rodzaju schorzeń układu kostnego. Opisane w ten sposób doniesienia literaturowe, uzasadniają naukowo podjęcie działań ukierunkowanych na ich syntezę oraz określenie aktywności biologicznej otrzymanych związków.

W tej części pracy Autorka nie uniknęła kilku błędów lub sformułowań, które są niepoprawne lub zredagowane w sposób za mało precyzyjny. Z obowiązku Recenzentki poniżej wymieniam niektóre z nich:

Strona 53: struktury pochodnych gemcytabiny czy cytarabiny są nie do końca poprawne;

Strona 56: struktury 5-fluorouracylu i jego pochodnych LXXVI oraz LX są błędne;

Strona 62: struktura HBED jest nieprawidłowa;

Strona 58: czy zastosowany skrót Bz dla pochodnej benzylowej jest poprawny?

Nie można było także znaleźć związków LIVIII oraz XLVII, XL, XLII w tabeli 5 (jak to jest przedstawione na str. 45 dysertacji). Mam też wrażenie, że powyższe związki nie są koniugatami- czy Doktorantka mogłaby się do tej sprawy odnieść?

Niektóre wyrażenia są też trochę niefortunne jak na przykład: sformułowania „deprotekcja” oraz „reflux” (str. 10. lub str. 37) są nieco zbyt żargonowe. Czy można je zastąpić innymi wyrazami lub wyrażeniami?

Sugeruję także zamienić określenie „grupa nukleofugowa” (str. 43) pojęciem „grupa o właściwościach nukleofilowych”. Korekty wymagają również sformułowania „właściwości biologiczne otrzymanych struktur” (strona 12); „geminalny atom węgla” (na stronie 14); czy

„wywierają również wpływ” (strona 19). W tym miejscu należy też stwierdzić, że znalezionych błędów jest naprawdę niewiele i że w żaden sposób nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy.

Na badawczą część rozprawy doktorskiej składają się cztery rozdziały. W pierwszej części Pani mgr inż. Dominika Kozicka opisuje wyniki własne związane z syntezą pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonianowych (ABPs) na drodze przekształcenia serii 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu **3a-3j** w 1-amino-1,1-alkilidenobisfosfoniany **5a-5j** zawierające grupę ochronną Cbz lub acetylową na atomie azotu. We wszystkich tych przypadkach kluczowa transformacja obejmowała zastosowanie odpowiednich soli trifenylofosfoniowych oraz fosforynu trietylu, w reakcjach typu „one-pot” lub sekwencyjnych. W kolejnych etapach, Autorka biegle przeprowadziła usunięcie grupy ochronnej oraz „hydrolizę” ugrupowania fosfodiesterowego, co pozwoliło jej na otrzymanie grupy dziewięciu pochodnych amino- kwasów bisfosfonowych **9a-9h** zawierających w pozycji *alfa* grupy odpowiadające podstawnikom charakterystycznym dla znanych α -aminokwasów oraz ich analogów tzw. niebiałkowych. Część tych wyników została zawarta w pracy pt. „One-pot and catalyst-free transformation of *N*-protected 1-amino-1-ethoxyalkylphosphonates into bisphosphonic analogs of protein and non-protein α -amino acids” (*Molecules*, **2022**, *27*, 3571).

Autorka opisała także metodę otrzymywania niesymetrycznych analogów fosfonowo-fosfinowych **7a-g** w postaci mieszanin diastereoizomerów (z wydajnościami od 62-91% oraz *dr* od 1:1 do 1:4) oraz fosfonowo-fosfinoilowych **6a-g** (wydajność 52-77%) w analogicznym podejściu, w reakcji Michaelisa-Arbuzowa, z zastosowaniem tetrafluoroboranu trifenylofosfoniowego oraz fenylofosfinem dietylu lub difenylofosfinem metylu. Reakcja usunięcia grup ochronnych znajdujących się na atomie azotu prowadzona z zastosowaniem katalizowanej palladem redukcji ($H_2/Pd(OH)_2/C$) nie doprowadziła jednak do otrzymania pożądanego serii α -aminodifenylofosforylo)metanofosfonianów, ale zakończyła się sukcesem w przypadku związku **10** (wydajność 87%). Finalnie, związek ten Doktorantka przeprowadziła w kwas 1-amino-1-difenylofosforylo)metanofosfonowy **11** i potwierdziła jego strukturę metodami spektroskopowymi.

W związku z tym fragmentem pracy (oraz związaną z nim częścią eksperymentalną) nasuwa mi się kilka pytań do Autorki pracy:

Co może być przyczyną otrzymania związku **3e** z **1e** z niższą wydajnością (32%)?

Czy dla związków **9a** (str. 142) oraz **9h** (str. 144) nie powinno być jakoś odnotowane, że widmo było otrzymane dla ich soli sodowych (tym bardziej, że wartości δ są odmienne od pozostałych w serii)?

Reakcja otrzymywania **7a-g** była monitorowana z zastosowaniem ^{31}P NMR. Czy umieszczony w pracy stosunek diastereoizomerów to otrzymany z surowej mieszaniny reakcyjnej, czy po izolacji? Przydałoby się także określenie, który sygnał np. w ^{31}P NMR odpowiadał któremu diastereoizomerowi (np. major, minor). Szczególnie ilość wyszczególnionych protonów w opisie związków z tej grupy sugeruje różny stosunek diastereoizomerów. Przykładowo, czy w opisie związku **7c** (*dr* 1:1.6) suma protonów jest prawidłowa? Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tego pytania. Proszę też o przypisanie sygnałów zawartych w opisie widma ^{13}C NMR (str. 139) do odpowiednich atomów węgla w związku **8f**.

Zastanawiam się także, dlaczego w załącznikach umieszczone były tylko widma związków **8a,9a**, chociaż są znane z doniesień literaturowych? Czym się Pani sugerowała przy ich doborze?

W kolejnym rozdziale dyskusji wyników Autorka pracy przedstawiła interesujący materiał dotyczący syntezy koniugatów modelowego 1-amino-1,1-bisfosfonianu z pochodnymi betuliny BN cechującej się właściwościami przeciwwirusowymi, na drodze reakcji sprzęgania. Doktorantka porównała dwie metody syntezy pochodnych betuliny **15-17**, z zastosowaniem DCC i HOBt w układzie DCM : MeOH przez 48h (metoda A, wydajności reakcji mieściły się w zakresie 34% - 77%) oraz w metodzie B, gdzie dzięki wspomagananiu ultradźwiękami i zastosowaniu DCC, w temperaturze 45-50°C (2-4 h) otrzymane zostały te same pochodne **15-17** z lepszymi

wydajnościami od 69% do 92%. Chociaż wyniki tych badań zostały zawarte w publikacji pt. "Ultrasound-assisted synthesis of new bisphosphonate–betulin conjugates and preliminary evaluation of their cytotoxic activity" *RSC Advances*, **2025**, *15*, 4086 oraz są przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych, mam następujące pytanie. Czy w trakcie izolacji związków **15-17** z mieszaniny reakcyjnej zawierającej DCU próbowano w pierwszej kolejności odparować rozpuszczalnik, a następnie przemyć mieszaninę schłodzoną do temperatury 0°C octanem etylu? W niektórych przypadkach metoda ta prowadzi w szybki sposób do oczyszczonych produktów reakcji.

Drugą z powyższych metod (Metodę B) zastosowano także do otrzymania koniugatów ABPs- związku **8a** z przeciwnowotworowym chlorambucylem, kwasem mykofenolowym (antybiotykiem), przeciwzapalną indometacyną czyli związków **18-20** z wydajnościami $\geq 90\%$ oraz z bromkami karboksyalkilotrifenilofosfoniowymi, w wyniku czego otrzymano związki **22-23**, wydajnościami 92%-94%. W przypadku zastosowania 5-karboksyuracylu metodą B otrzymano bisfosfonianową pochodną **21** (wydajność 33%), podczas gdy alternatywna metoda sprzęgania z użyciem HATU oraz zasady Hünig (w DMF) pozwoliła na uzyskanie docelowego **21** z wydajnością 61%. Przeprowadzona w dalszym etapie transformacja z TMSBr prowadziła do otrzymania pochodnych kwasów bisfosfonowych **24-28**, których charakterystyka spektroskopowa zawarta jest w części eksperymentalnej dysertacji.

W tej części pracy chciałabym także zwrócić Doktorantce uwagę na pewne, nieliczne niedociągnięcia:

Strona 83: na rysunku nie można znaleźć pochodnej iperytu azotowego;

Strony 84, 86, 87 (oraz strona 11): co kierowało Doktorantką, że przedstawiła niedominującą formę tautomeryczną pierścienia w 5-karboksyuracylu?

Kolejny nurt badań przedstawionych w pracy doktorskiej skupiał się na tematyce wykorzystania modyfikowanych pochodnych aminobisfosfonianowych jako znaczników diagnostycznych. W tym celu doktorantka zastosowała pochodną deferoksaminy DFO jako chelator oraz radioaktywny izotop cyrkonu ^{89}Zr . Autorka zaobserwowała, że najlepszą reakcją prowadzącą do otrzymania związku $\text{N-SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ **30** jest reakcja sprzęgania związku **8** z *N*-(3-karboksypropanoilo)-deferoksamina **29** z użyciem HATU oraz DIPEA. Następnie, podjęto próby przeprowadzenia związek **30** w odpowiedni kwas bisfosfonowy **31**. Wobec problemów, pochodna **30** o czystości 85%, została zastosowana do kompleksowania oraz określenia stabilności chelatów ^{89}Zr . Badanie przeprowadzone w trzech warunkach z zastosowaniem metody radio-TLC wykazało jednak, że modyfikacja DFO z zastosowaniem estrów kwasów α -amino-bisfosfonowych nie poprawiła stabilności kompleksu z ^{89}Zr .

W tym miejscu poproszę także o wyjaśnienie: która nazwa mesylan czy mezylan (str. 89) jest bardziej prawidłowa?

Ostatni rozdział omówienia wyników zawierał ocenę działania cytotoksycznego oraz przeciwbakteryjnego pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych oraz ich koniugatów, których synteza została opisana w poprzednich rozdziałach. Doktorantka wykazała, że największą cytotoksyczność wobec linii komórkowej U-2 OS kostniakomięsaka, określoną z zastosowaniem testu MTS, w odniesieniu do zoledronianu o znanej aktywności biologicznej, posiadał związek **9a** z IC_{50} (6.16 μM). Dodatkowe badanie wykonane na nienowotworowej linii komórkowej BJ1-hTERT dla związku **9a** oraz zoledronianu wykazały ich niższą toksyczność, co wskazuje na potencjalną selektywność działania otrzymanego związku. Dalsze badania aktywności metabolicznej wobec komórek linii U-2 OS wykonano dla kombinacji pochodnej **9a** z różnymi cytostatykami, między innymi cis-platyną, doksorubicyną, metotreksatem, gemcytabiną, kamptotecyną oraz aktynomycyną czy nutliną -3a, a czasami ich mieszaninami. Autorka wykazała, że dla większości testowanych układów związek **9a** zwiększa działanie cytotoksyczne w porównaniu z działaniem pojedynczych leków przeciwnowotworowych. Dodatkowo, porównane zostały właściwości przeciwbakteryjnych (wobec *Staphylococcus aureus*) oraz

toksyczność (wobec linii komórkowych MG-63 oraz L-929) serii analogów kwasów bisfosfonowych **9a-j**, przy czym najkorzystniejszą aktywność wykazywały analogi norwaliny oraz norleucyny **9c** oraz **9d**. Dalsza część rozprawy związana jest z badaniami aktywności cytotoksycznej otrzymanych koniugatów mono- lub dipodstawionych aminobisfosfonowych betuliny, względem betuliny BN, wobec linii komórkowych U-2 OS, A549 oraz AGS. Doktorantka określiła, że otrzymany związek **17** posiada najwyższą aktywność cytotoksyczną w zakresie stężeń mikromolowych, chociaż nie wykazuje selektywności w stosunku do komórek zdrowych czy nowotworowych. Analogiczne badanie za pomocą testu MTS wykonano także dla serii estrów kwasów bisfosfonowych **8a-i**, przy czym stwierdzono brak istotnej aktywności cytotoksycznej wobec komórek U-2 OS.

W części eksperymentalnej pracy doktorantka zwięźle opisała procedury syntetyczne prowadzące do zaprojektowanych związków, w pełny sposób przedstawiła charakterystykę otrzymanych związków. Do tej części mam drobną uwagę, by w przyszłości unikać sformułowań żargonowych np. „rozpuszczalnik odparowano na wyparcie” (str. 152).

Tak jak wspomniałam powyżej, efektem pracy doktorskiej były wyniki opublikowane w formie czterech oryginalnych publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz dwa zgłoszenia patentowe, każda z powyższych pozycji ma odniesienie w pracy ilustrujące ogromny wkład Doktorantki w przygotowanie publikacji. Opis wielu podejść do syntezy związków docelowych wskazuje na biegłość Doktorantki w zakresie syntezy organicznej. Pracę tą czyta się z dużym zainteresowaniem. Co zasługuje na dodatkowe podkreślenie Doktorantka nie tylko podjęła się syntezy i charakterystyki docelowych związków, ale też przeprowadziła badania aktywności biologicznej w Pracowni Molekularnych Mechanizmów Terapii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach oraz ocenę biokompatybilności w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej wskazuje na dużą znajomość tematyki. Znajdujące się w dysertacji opisy technik badawczych, procedur syntetycznych, charakterystyki otrzymanych produktów oraz dane dotyczące badań biologicznych są opisane wyczerpująco- tak aby spełniały standardy konieczne do opublikowania wyników w rygorystycznych kryteriach międzynarodowych. Związki znane z literatury zostały scharakteryzowane i porównane z referencyjnymi. Wszystkie schematy, rysunki oraz tabele są ponumerowane, w tekście znajdują się odsyłacze do rysunków, schematów i tabel. Praca zawiera cytowania z 204 źródeł literaturowych. Źródła dobrano i wykorzystano prawidłowo. Spis rzeczy i odsyłacze wykorzystano prawidłowo. Na uwagę zasługuje wyróżnienie nazwisk Autorów cytowanych publikacji za pomocą kursywy, przy każdorazowym do nich odniesieniu w tekście.

Doktorantka doskonale opanowała technikę pisania opracowań naukowych, umiejętnie interpretuje istniejące fakty, potrafi przeprowadzić dyskusję uzyskanych wyników i wyciągać właściwe wnioski.

Wniosek końcowy

W mojej opinii praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i może być podstawą nadania stopnia naukowego doktora, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne. Wobec tego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Dominiki Kozickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę obszerny i wartościowy naukowo poziom merytoryczny badań zawartych zarówno w naukach ścisłych jak i przyrodniczych, logiczną i klarowną dyskusję uzyskanych wyników, a także fakt opublikowania wyników w postaci publikacji w renomowanych czasopiśmie oraz zawartych w zgłoszeniach patentowych, zgłaszam wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem,
Podpisano odręcznie przez autora