



Politechnika Wroclawska

Wroclaw, 11. 03. 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

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Kaczmarek
 *α -Hydroksyfosfonianowe pochodne węglowodanów oraz aminokwasów
– synteza i właściwości*
wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Henryka Koroniaka
(promotor pomocniczy: Pani dr Magdalena Rapp)
w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wprowadzenie

Od ponad pół wieku syntetyczne związki fosforoorganiczne są niesłabnącą inspiracją dla badaczy pracujących na pograniczu chemii organicznej, bioorganicznej i medycznej, poszukujących nowych cząsteczek bioaktywnych o zastosowaniu terapeutycznym. W ujęciu historycznym najbardziej eksplorowanym szkieletem okazał się prawdopodobnie układ N-C-P przez swoje podobieństwo do fragmentu strukturalnego występującego w aminokwasach i peptydach. Grupa zawierająca atom fosforu (fosfonowa lub fosfinowa) ma co prawda inną geometrię, strukturę elektronową, kwasowość czy zdolność kompleksowania jonów metali niż funkcja karboksylowa, wykazuje natomiast duże podobieństwo do struktury substratów aminokwasowych lub peptydowych w stanach przejściowych reakcji enzymatycznych. Ta cecha daje możliwość kompetycyjnego wiązania do centrów aktywnych i inhibicji białek katalitycznych zaangażowanych w procesowanie aminokwasów lub peptydów, np. enzymów proteolitycznych. Innym rodzajem analogii strukturalnej jest podobieństwo związków C-P do estrów kwasu ortofosforowego lub do mieszanych estrów/bezwodników zawierających wysokoenergetyczne, labilne hydrolitycznie wiązanie P-O-P. Wśród takich związków na szczególną uwagę zasługują bisfosfoniany, które znalazły zastosowanie w leczeniu osteoporozy i innych chorób kości. Zakład Syntezy i Struktury Związków Organicznych kierowany przez prof. Henryka Koroniaka specjalizuje się natomiast w syntezie

fluoroalkilofosfonianów jako analogów fosforanów, a wprowadzenie atomu/atomów fluoru do cząsteczki ma na celu uzyskanie właściwości fizykochemicznych (polarności, lipofilowości czy kwasowości fosfonianu) zbliżonych do układów natywnych.

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Kaczmarek wpisuje się w ten nurt badawczy i dotyczy fosfonianów opartych na pięcioczłonowych układach cyklicznych. Układy te są wybranymi pochodnymi monosacharydów lub aminokwasów, które – po przekształceniu w pochodne karbonylowe – poddano addycji z fosforynem dialkilowym. Otrzymane w ten sposób związki P-C badano w reakcjach deoksyfluorowania z wykorzystaniem reagentów generujących nukleofilowy anion fluorkowy.

Ocena pracy

Wyniki pracy doktorskiej Pani P. Kaczmarek zredagowane zostały w formie klasycznej, choć prawie 350-stronicowej rozprawie, wydanej w formie dwóch tomów. Podział treści dysertacji jest typowy dla prac eksperymentalnych i zawiera trzy główne części: część literaturową, omówienie i dyskusję wyników oraz część eksperymentalną. Dodatkowe krótsze rozdziały to wprowadzenie i cel pracy, poprzedzające zasadniczą treść doktoratu, a także podsumowanie i wnioski, umieszczone na jego zakończenie. Praca ilustrowana jest 174 odnośnikami literaturowymi zebranymi w rozdziale bibliografia. Zawartość pierwszego tomu uzupełnia wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki. Zgodnie z rekomendowanymi obecnie standardami publikacji, do pracy dołączono atlas widm, który stanowi główną zawartość tomu drugiego. Uzupełniają go opublikowane artykuły będące wynikiem doktoratu. Jest to zawartość kompletna a czytelnik znajduje wszystkie informacje niezbędne do płynnego poruszania się w treści rozprawy, a także – w kontekście recenzji – do oceny realizowanego tematu i związanych z nim osiągnięć formalnych. Edycja i strona graficzna dokumentu są staranne.

Wprowadzeniem do badań własnych Doktorantki jest około 35-ciostronicowy, wielowątkowy wstęp literaturowy. Materiał w nim przedstawiony podzielono na cztery części, w kolejności są to: wybrane aspekty aktywności biologicznej fosfonianów, metody tworzenia wiązania P-C, wpływ wprowadzenia atomu/atomów fluoru do cząsteczki związku organicznego na jego właściwości fizykochemiczne i strukturę oraz omówienie metod i mechanizmów służących dokonaniu takich modyfikacji. Jest to dosyć szeroki zakres materiału, który obejmuje obszerny zakres wiedzy podstawowej. Autorka dokonała arbitralnego wyboru literatury źródłowej prezentując fundamentalne, miejscami wręcz podręcznikowe informacje. Bibliografia tego rozdziału zawiera wiele rozdziałów książkowych, publikacje przeglądowe i przełomowe (historyczne) artykuły oryginalne. Biorąc pod uwagę kryterium komplementarności treści wprowadzenia do zawartości pracy, dobór ten nie budzi zastrzeżeń. Studia literaturowe są w pełni adekwatne do materiału badań własnych i właściwie ukierunkowują czytelnika do odbioru dyskusji wyników. Bardziej szczegółowe dane,

najnowsze przykłady literaturowe i pogłębione dyskusje są jednak ograniczone. Przykładowo, w pierwszym podrozdziale poświęconym aktywności biologicznej fosfonianów nie wspomniano o ważnych grupach związków stosowanych jako leki czy agrochemikalia, a dla podanych przykładów praktycznie nie dyskutowano aspektów strukturalnych czy mechanizmów działania na poziomie molekularnym. Nie czyniąc z tej uwagi zarzutu i akceptując ograniczenia związane z koniecznością wyboru i prezentacji materiału, przedstawiam raczej alternatywny punkt widzenia jako zwolennik węższych, bardziej wyspecjalizowanych, a przez to wyczerpujących analiz. Część literaturowa jest zredagowana płynnym i w większości poprawnym językiem. Liczba potknięć gramatycznych i błędów typograficznych jest niewielka. Na granicy tych ostatnich i drobnych uchybień merytorycznych czy żargonu lokują się takie stwierdzenia jak: „kwasy aminofosfinianowe” (str. 29, Rys. 3), „fosfoleucyna” (str. 31, Rys. 5) czy „liniowy fosforan (np. fosforyn dibutyłu)” (str. 44). Nie zaburzają one jednak płynnego odbioru treści i nie wpływają na pozytywną ocenę tego fragmentu dysertacji.

Opis badań własnych jest zasadniczą częścią rozprawy, liczy ponad 70 stron i został podzielony na podrozdziały zgodnie z kolejnymi reakcjami przeprowadzonymi na poszczególnych związkach. W pierwszej części omówiono wyniki syntez substratów dla fluorowania, tj. estrów kwasów α -hydroksyfosfonowych zawierających pięcioczłonowy układ cykliczny. Układy te są wybranymi, odpowiednio chronionymi monosacharydami lub aminokwasami, które przekształcono/utleniono do związków karbonylowych w kilkietapowych ścieżkach syntetycznych. Wychodząc z pochodnej α -D-glukofuranozy otrzymano C3 keton w wyniku utlenienia Collinsa oraz o atom węgla krótszy C5 aldehyd w wyniku rozszczepienia wyjściowego ketalu. Substratami aminokwasowymi były *N,O*-izopropylidenoseryna oraz prolina będące różnorodnie chronione na grupie aminowej. Odpowiednie aminale uzyskano na drodze redukcji grupy estrowej i utleniania Swerna otrzymanego alkoholu. Wszystkie związki karbonylowe zostały poddane addycji z fosforynem dialkylowym w obecności aminy trzeciorzędowej (reakcja Pudowika). Produkty otrzymano jako mieszaninę dwóch diastereoizomerów w różnym stosunku w zależności od struktury użytego substratu. Najwyższe wartości *de* obserwowano dla karbaminianowych pochodnych *N,O*-izopropylidenoseryny. Dla niektórych par stereoizomerów powiódł się ich rozdział chromatograficzny. Opierając się na analizie stałych sprzężeń oraz korelacjach w widmach NMR, a także na modelach teoretycznych i analizie rentgenograficznej, każdemu diastereoizomerowi przypisano konfigurację absolutną. Rozdział ten stanowi bardzo solidną część pracy i nie zmienia tego faktu, że część danych była wcześniej opublikowana w literaturze naukowej. Przeprowadzenie wieloetapowych syntez z wysokimi wydajnościami na wymagających układach i interpretacja wyników wraz z aspektami stereochemicznymi pokazuje bardzo dobre opanowanie warsztatu i profesjonalizm Doktorantki.

W związku z tym fragmentem pracy nasuwa się pytanie, czy w reakcji Pudowika były brane pod uwagę inne fosforiny dialkylowe, np. diizopropylowy, co prawdopodobnie znacznie podniosłoby stereoselektywność addycji.

Otrzymane hydroksyfosfoniany poddano fluorowaniu z użyciem reagentów generujących nukleofilowy anion fluorkowy. Wyniki okazały się zróżnicowane w zależności od struktury substratu. Dla gluko/allofuranozowej pochodnej drugorzędowego hydroksyfosfonianu reakcja nie dała pozytywnych wyników z użyciem trifluorku dietyloaminoosiarki (DAST). Natomiast hydroksyfosfonian otrzymany z aldehydu o szkieletie furanozy reagował słabo – dla zoptymalizowanych warunków wydajność wyniosła jedynie 26%. Reakcje deoksyfluorowania nukleofilowego dla pochodnych *N,O*-izopropylidenoseryny prowadziły do produktów przegrupowania, przede wszystkim takich, które nie zawierały w swojej strukturze atomu fluoru. Doktorantka zaproponowała mechanizmy tworzenia układu bicyklicznego z udziałem fragmentu karbaminianu, a także innych produktów ubocznych, w tym azyrydiny analogicznej do otrzymanej uprzednio fosfomycyny. Jedynym związkiem fluorowanym okazał się produkt będący wynikiem przegrupowania związanego z otwarciem i zamknięciem pierścienia oksazolidynowego. Produkt ten jako główny powstawał z wysoką stereoselektywnością w przypadku pochodnej *N*-benzylowej. Użycie alternatywnego odczynnika fluorującego tj. fluorku 2-pirydynosulfonylu (PyFluor) w warunkach zasadowych prowadziło jedynie do transformacji grupy hydroksylowej w sulfonową. Podobnie złożona sytuacja miała miejsce dla pochodnych proliny. α -Fluorofosfoniany nie powstawały lub powstawały w niewielkim stopniu, natomiast miały miejsce przegrupowania związane z powstawaniem niefluorowanych produktów bicyklicznych lub ekspansją pierścienia pirolidynowego do piperydynowego. Dla pochodnych *N*-Cbz i *N*-Boc kierunek przemian silnie zależał od konfiguracji absolutnej substratów a mniej od warunków reakcji czy użytego trifluorku bisalkilaminoosiarki. Zaproponowano mechanizmy powstawania, zarówno układu bicyklicznego z udziałem grupy karbaminianowej, jak i 3-fluoropiperydyno-2-fosfonianów o określonej stereochemii, przebiegającego przez bicykliczny związek azyrydyniowy, które są spójne z poprzednimi wynikami oraz danymi literaturowymi. Co oczywiste, dla *N*-benzylowej pochodnej obserwowano tylko ten drugi rodzaj produktu fluorowania, a wyniki tym razem zależały od warunków reakcji.

Mimo braku zdecydowanie jednoznacznych wyników fluorowania, tą część dysertacji czyta się z dużym zainteresowaniem. Doktorantka prowadzi dyskusję nakreślając i rozwiązując problemy kolejnych etapów syntezy, rozdziału mieszanin poreakcyjnych, określania stereochemii końcowych związków oraz rozważając aspekty mechanistyczne mające na celu wytłumaczenie przebiegu reakcji i uzyskania nietrywialnych produktów. Jest to profesjonalne podejście, znamionujące odczytanie i ciekawość naukową. Dzięki uzyskanym wynikom i tej dociekliwości powstały dwie z trzech publikacji stanowiących dorobek doktoratu opublikowany w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* w latach 2017/2018. Artykuł dotyczący fluorowania hydroksyfosfonianowych pochodnych cukrowych ukazał się w

Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements (bieżący współczynnik wpływu $IF = 0.674$), natomiast praca dotycząca pochodnych aminokwasowych w czasopiśmie *open access RSC Advances* ($IF = 2.936$). Obie pozycje są trójautorskie a w skład zestawu autorów wchodzi Doktorantka, Promotor i Promotor pomocniczy. W drugiej ze wspomnianych prac Pani mgr P. Kaczmarek jest pierwszą współautorką.

W ramach jedynej uwagi merytorycznej dotyczącej tego fragmentu dysertacji mam pytanie odnośnie stwierdzeń „rozkład substratów” czy „częściowy rozkład substratów”, które padają np. w tabelach 11 i 12. Rozumiem, że Autorka ma na myśli rozpad hydroksyfosfonianu? Czy jest to reakcja retro-Abramowa (tak jak dalej w tabeli 16), czy przegrupowanie fosfonianowo-fosforanowe, co stosunkowo łatwo można stwierdzić wykorzystując ^{31}P NMR, czy też sytuacja była bardziej złożona. Natomiast sformułowanie „wyjściowe substraty”, które pojawiło się kilkukrotnie w tekście, uznaję za przeoczenie w korekcie edycji dokumentu.

Ostatni fragment dyskusji wyników poświęcony jest reakcji badanych α -hydroksyfosfonianów z *p*-toluenosulfonamidem w obecności zasady dla otrzymania odpowiednich α -aminofosfonianów. Podobnie jak dla fluorowania reaktywność substratów zależała od ich struktury. Dla pochodnych *N*-Boc oraz *N*-Cbz seryny i proliny obserwowano oczekiwany przebieg, zgodny z mechanizmem reakcji retro-Abramowa i Kabaczniaka-Fieldsa. Użycie pozostałych związków wyjściowych nie przyniosło pozytywnych wyników. Ten fragment pracy złożył się na większą całość, która stała się przedmiotem trzeciej ze wspomnianych publikacji w dorobku Doktorantki (*RSC Advances*, 2018). Zawarto w niej wyniki uzyskane dla dwóch wymienionych substratów i trzech innych hydroksyfosfonianów, które nie wchodziły w zakres rozprawy, ale były badane w Zakładzie kierowanym przez Promotora. Pani mgr P. Kaczmarek jest trzecią na liście siedmiu współautorów publikacji.

Część eksperymentalna rozprawy to także obszerny, ponad 70-ciostronicowy opis technik badawczych, procedur syntetycznych, a przede wszystkim charakterystyki otrzymanych produktów. Część ta nie wymaga dużej uwagi Recenzenta. Związki znane z literatury zostały scharakteryzowane i porównane z referencyjnymi. Natomiast wszystkie nowe struktury zostały wyczerpująco opisane, tak aby spełnić standardy konieczne do opublikowania wyników zawartych w trzech przygotowanych wcześniej publikacjach. Opisy są dodatkowo ilustrowane atlasem widm. Dane te zostały poddane rygorystycznym kryteriom międzynarodowych ekspertów związanym z procesem ewaluacji i publikacji materiału. Są starannie zredagowane: wraz z nazwami i numerami związków ponownie podane są struktury i schematy reakcji, nie ma konieczności poszukiwania ich w rozdziałach badań własnych.

Podsumowując, Pani mgr P. Kaczmarek przedłożyła starannie wykonaną i sformułowaną pracę doktorską z zakresu syntezy organicznej. Okazała się uważnym eksperymentatorem, nie ograniczyła się do uproszczonego podania wyników reakcji. Dążyła do wydzielania wszystkich składników mieszanin, zidentyfikowania ich struktur, określenia

konfiguracji i praktycznie w każdym przypadku zaproponowała mechanizmy ich tworzenia. Pokazuje to duże odczytanie w tematyce, wyobraźnię i umiejętność krytycznej oceny Autorki. Tak przygotowane i zinterpretowane wyniki badań udało się w całości opublikować. Nie zdarza się to często w przypadku doktoratów i zasługuje na dodatkowe podkreślenie. Szczególnie w tym przypadku, w którym wyniki okazały się niejednoznaczne, nie miały uogólnionego charakteru a zależały od struktury związków i warunków prowadzenia reakcji. Wytlumaczenie tych uwarunkowań, nieoczekiwanego przebiegu i stereochemii produktów okazało się równie interesujące.

Wniosek końcowy

Krytyczna lektura pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Kaczmarek upoważniają mnie do jednoznacznego stwierdzenia, że odpowiada ona 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. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę poziom merytoryczny badań oraz fakt opublikowania całości wyników zgłaszam wniosek o wyróżnienie.

