

POLSKA AKADEMIA NAUK



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 0 61 852 85 03, sekretariat 0 61 852 89 19
fax: 0 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327
NIP 777-00-02-062

Dr hab. Marcin K. Chmielewski, prof. nadzw. IBCh PAN

Poznań, 18.08.2017

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

Ul. Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Agaty Marii Pawłowskiej

pt. " Synteza, reaktywność oraz zastosowanie fluorowanych fosfonianowych analogów homofenyloalaniny i fenyloglicyny"

Przedstawiona do recenzji dysertacja Pani mgr Agaty Marii Pawłowskiej została wykonana w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza pod kierunkiem pani prof. UAM dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki. Rozprawa dotyczy syntezy oraz badania właściwości nowych fluorowanych związków chemicznych należących do grupy α -aminofosfonianów, które są analogami strukturalnymi homofenyloalaniny i fenyloglicyny. Obecność perfluorowanego pierścienia aromatycznego w otrzymanych pochodnych pozwoli na badanie nowych oddziaływań międzycząsteczkowych oraz może poprawić transport komórkowy tych związków, co do których zostanie określona aktywność biologiczna. Głównym bodźcem do przeprowadzenia chemicznej syntezy zaprezentowanych w rozprawie związków chemicznych były przesłanki o ich potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych i antybakteryjnych. Wykazanie potencjalnej aktywności biologicznej lub terapeutycznej nowych związków chemicznych jest obecnie kluczową przesłanką do podjęcia prac koncepcyjnych nad opracowaniem metody ich chemicznej syntezy. Istnieje wiele przykładów aktywnych związków terapeutycznych, których budowa oparta jest na α -aminofosfonianach. Mając na uwadze potencjał aplikacyjny fluorowanych fosfonianowych analogów homofenyloalaniny i fenyloglicyny doktorantka pojęła się ambitnego celu

przeprowadzenia chemicznej syntezy oraz zastosowania otrzymanych związków w syntezie analogów dipeptydowych, funkcjonalizacji nanorurek węglowych (które mogą być nanoosinikami dla biocząsteczek) oraz badania cytotoksyczności względem nowotworowych linii komórkowych. W ocenie recenzenta przedstawiony materiał jest bardzo obszerny, a doktorantka przedstawiła dogłębną analizę nie ograniczając się jedynie do syntezy, ale próbując zastosować multidyscyplinarne podejście do tematu badawczego wskazując na potencjalne zastosowanie dla syntetyzowanych przez siebie związków. Zakres tematyczny oraz sposób prezentacji zasługuje na uznanie i pokazuje dojrzałość naukową kandydatki.

Rozprawa doktorska jest obszerna i na 303 stronach zawiera typowe dla tego typu opracowań części: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, część literaturową, cel pracy, wyniki i dyskusję, ważniejsze osiągnięcia rozprawy, podsumowanie i wnioski, część eksperymentalną, literaturę (która zawiera 302 pozycje) oraz załączniki w postaci skanów otrzymanych widm NMR. Praca została przygotowana z najwyższą starannością, o czym świadczy wysoka estetyka prezentacji oraz dbałość o detale. Na szczególne wyróżnienie zasługuje multidyscyplinarność podejścia gdzie obok wzorowo zaprezentowanych syntez organicznych doktorantka z dużą sprawnością prezentuje charakterystykę spektralną otrzymanych związków, analizy otrzymanych sfunkcjonalizowanych nanostruktur (np. analiza mikroskopowa czy analiza termogravitacyjna) oraz analizę cytotoksyczności. Zastosowanie elementów nanotechnologii w postaci funkcjonalizacji nanorurek węglowych podnosi wartość tej pracy wykonanej przez osobę o przygotowaniu czysto chemicznym. Dzięki przejrzystości poruszanie się po rozprawie nie sprawia dużych problemów, a jedynym dostrzeżonym przez recenzenta mankamentem jest fakt, nie zaprezentowania zbiorczej tabeli ze wszystkimi nowo otrzymanymi związkami. Dzięki temu łatwo można byłoby znaleźć te wyniki, które stanowią oryginalność pracy doktorskiej.

Część literaturowa wprowadza czytelnika w tematykę z zakresu fluorowanych związków fosforoorganicznych. Doktorantka po wprowadzeniu w temat fluoropochodnych związków organicznych i po omówieniu ich właściwości przedstawia charakterystykę fosfonianów i aminofosfonianów będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej. Bardzo ciekawie przedstawia aktywność biologiczną aminofosfonianów, wskazując na ich właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne, chwastobójcze oraz przeciwnowotworowe. Z opracowania można się dowiedzieć, że aminofosfoniany są również dobrymi inhibitorami szeregu enzymów takich jak: aminopeptydaza, liaza fenyloalaninowa oraz katepsyna. Opis ten jednoznacznie wskazuje, że α -aminofosfoniany należą do interesującej z punktu widzenia właściwości terapeutycznych, klasy związków chemicznych i zasadnym wydaje się rozpoczęcie prac badawczym nad ich syntezą. W dalszej części

opracowania pani Pawłowska przedstawia rozdział opisujący etapy chemicznej syntezy α -aminofosfonianów kolejno opisując: addycję nukleofilową do fluorowanych iminofosforanów, reakcję Kabachnika-Fields'a, redukcję iminofosfonianów i oksymów. Część literaturową kończy bardzo interesujący rozdział dotyczący funkcjonalizacji nanorurek węglowych. Nanorurki są nanomateriałem, który znajduje coraz szersze zastosowanie, dzięki dość łatwej chemicznej funkcjonalizacji ich powierzchni. Przygotowany przez doktorantkę materiał dotyczący stanu wiedzy na temat funkcjonalizacji nanorurek węglowych jest tak dobry, że w ocenie recenzenta mógłby stanowić część większego artykułu naukowego lub w całości jako mini artykuł przeglądowy. Jeżeli publikacja nie byłaby możliwą w zagranicznym periodyku to na pewno przedstawiony materiał powinien zostać opublikowany w jednym z polskich czasopismach naukowych np. takich jak Biotechnologia, która posiada specjalny dział dotyczący bionanotechnologii. W tym miejscu chciałbym gorąco zachęcić autorkę tego opracowania do rozważenia publikacji artykułu przeglądowego dotyczącego funkcjonalizacji nanorurek węglowych.

Na tym etapie oceny chciałbym poprosić doktorantkę o dyskusję w następującym zakresie tematycznym:

1. atom fluoru jako bardzo elektroujemny i posiadający wolne pary elektronowe może być akceptorem protonu. Tworzy oddziaływanie z atomem wodoru, który poprzez spolaryzowane wiązanie jest połączony z innym heteroatomem. Takie oddziaływania nazywamy wiązaniami wodorowymi. W obliczu coraz szerszego wykorzystywania organicznych związków fluorowanych obserwuje się liczne przykłady wiązań wodorowych z udziałem atomów fluoru. Proszę zatem doktorantkę o przedstawienie krótkiej charakterystyki wiązania wodorowego z udziałem atomu fluoru i odpowiedź na pytanie: Czy zdaniem doktorantki wiązania wodorowe tworzące się z udziałem atomu fluoru mogłyby być alternatywą dla tworzenia i stabilizacji struktur drugorzędowych biopolimerów. Proszę o przedstawienie literaturowych przykładów siły tego wiązania w zależności od atomu z jakim jest związany atom fluoru oraz przedstawienie technik pomiarowych stosowanych w badaniach wiązań wodorowych.

Dyskusja Wyników poprzedzona jest wielowątkowym opisem celów ocenianej pracy. Doktorantka postawiła sobie szereg celów do zrealizowania począwszy od chemicznej syntezy fluorofosfonianowych analogów aminokwasów poprzez wprowadzenie ich w strukturę białek, aż do zastosowania ich w funkcjonalizacji powierzchni węglowych nanorurek. W opisie celu pracy zabrakło jednak wyartykułowania hipotez badawczych, które później byłyby weryfikowane doświadczalnie przez autorkę.

Chemiczną syntezę fluorowanych fosfonianowych analogów aminokwasów autorka rozpoczęła od syntezy aldehydu **4.4**. Aldehyd ten jest kluczowym półproduktem dlatego też otrzymanie jego wymagało od doktorantki dużo wysiłku oraz opracowania drugiej wydajniejszej metody gdy okazało się że zaproponowany pierwszy szlak syntetyczny jest niewystarczający. Doktorantka w dość wyczerpujący sposób wyjaśniła mechanizmy i przyczyny niepowodzeń syntetycznych. Przeprowadzenie wydajnej syntezy aldehydu **4.4** pozwoliło, wykorzystując procedurę Kabachnika-Fields'a, otrzymać 9 analogów perfluorowanych homofenyloalaniny (związki **4.13**). Tę samą procedurę (jednakże po eliminacji silnego nukleofila jakim jest NaH) zastosowano w syntezie analogów fenyloglicyny stosując jako substrat handlowo dostępny aldehyd **4.1**. Tym razem autorka otrzymała 11 fluorowanych fosfonianowych analogów fenyloglicyny (związki **4.16**). Wszystkie otrzymane komponenty zostały prawidłowo scharakteryzowane za pomocą analizy NMR, a ich masy potwierdzone w analizie masowej. Struktury 4 analogów homofenyloalaniny (związki **4.13b,c,d,e**) i 4 analogów fenyloglicyny (związki **4.16a,b,c,f**) zostały dodatkowo potwierdzone w monokrystalicznej analizie rentgenograficznej co dodatkowo podnosi wartość otrzymanych wyników.

Kolejne rozdziały przedstawiają badania syntetyczne nad aromatyczną substytucją nukleofilową w pierścieniu perfluorowanym z wykorzystaniem kolejno cysteiny, seleno-L-cysteiny, glutationu, azydru sodu, kwasu benzoesowego oraz fenolu. Cały szereg przeprowadzonych syntez i obserwacji pozwolił na wyciągnięcie wniosków ogólnych dotyczących wpływu rozpuszczalnika na przebieg aromatycznej substytucji nukleofilowej w perfluorowanym pierścieniu aromatycznym. Doktorantka udowodniła na podstawie modelowej reakcji z etanolem, że obecność silnej zasady jakim jest wodorotlenek potasu powoduje podstawienie w pierścieniu aromatycznym głównie w pozycję *para*.

Związki chemiczne odgrywające największe znaczenie w poszukiwaniach inhibitorów enzymów posiadają jednak w swojej strukturze wolną grupę aminową oraz wolne ugrupowanie fosforanowe. Dlatego autorka podjęła działania syntetyczne w celu usunięcia grup blokujących z funkcji fosfonianowej i aminowej poprzez dealkilowanie otrzymanych analogów przeprowadzając je w litowe sole fosfonianowe oraz dealkilowania za pomocą katalitycznego uwodornienia w celu uzyskania wolnej grupy aminowej. Usunięcie grupy blokującej z funkcji aminowej pozwoliło na wykorzystanie perfluorowanych aminofosfonianów w syntezie wiązania peptydowego oraz otrzymanie fosfonianowych analogów dipeptydów. Doktorantka zastosowała zarówno aminokwasy aromatyczny (fenyloalanina Phe, tryptofan Trp) jak i alifatyczny (glicyna Gly, izoleucyna Ile, prolina Pro). Tworzenie wiązania peptydowego szczególnie stosując nowe modyfikowane aminokwasy jest przedsięwzięciem trudnym i wymaga doboru odpowiedniego czynnika kondensującego.

Pomimo tego, że doktorantka prawidłowo przeprowadziła proces syntezy to otrzymane wydajności końcowych dipeptydów były niskie. W toku prac badawczych zaproponowała mechanizm tworzenia fosfonianowych analogów dipeptydowych oraz zidentyfikowała obniżający wydajność cykliczny dipeptyd **5.20**. Badania te oceniam bardzo wysoko jako pionierski wkład w zrozumienie reakcji ubocznych podczas chemicznej syntezy wiązania peptydowego. Napotkane przez doktorantkę trudności podczas syntezy wiązania peptydowego były prawdopodobnie związane z nieodpowiednim doбором czynnika kondensującego.

Analiza wyników oraz dyskusja są zilustrowane dużą ilością grafiki, na którą składa się: 5 schematów przedstawiających struktury i modele chemiczne, 41 schematów obrazujących i wyjaśniających przeprowadzone szlaki syntetyczne oraz mechanizmy dyskutowane w pracy, 19 rysunków obrazujących analizę widm NMR, struktur krystalograficznych, widm adsorpcyjnych, termogramów oraz analizy mikroskopowej oraz 21 tabel. Sposób prezentacji wyników pokazuje, że doktorantka rozumie i potrafi wyjaśnić zachodzące przemiany chemiczne zarówno w zakresie preparatyki jak i mechanizmów chemicznych. Dodatkowo wykazała się znajomością technik stosowanych w nanotechnologii. Przekształcenia chemiczne poparte są dogłębną analizą widm rezonansu jądrowego dla jąder wodoru, węgla i fosforu. W tym miejscu należy docenić wysiłek, jaki doktorantka włożyła w analizy wykazując tym samym biegłą znajomość technik NMR oraz technik masowych, które są obecnie niezbędnym narzędziem chemika-syntetyka.

Na zakończenie analizy dysertacji, spełniając obowiązek recenzenta, chciałbym zwrócić doktorantce uwagę na nieliczne drobne błędy językowe oraz niedociągnięcia merytoryczne. Należy stwierdzić, że jest ich tak niewiele, że w żaden sposób nie mogą wpłynąć na pozytywną ocenę rozprawy. Dla przykładu podaję tylko te najpoważniejsze:

Strony 10-12 w spisie treści nie stosujemy skrótów

Strona 35 stwierdzenie „wpływ fluorowania na właściwości fizyczne ...” jest niewłaściwe, zdaniem recenzenta to atom fluoru wpływa na właściwości, a nie reakcja fluorowania

Strona 36 wiersz 15, jakie wiązanie jest podatne na hydrolizę i eliminuje fosforany w syntezie leków? Diestry fosforanowe i monoestry fosforanowe są stabilne, czy doktorantka miała na myśli wiązanie trójestrowe?

Strona 53 jest *propagilowego* a powinno być *propargilowego*

Strona 85 w celu pracy brak jest numerów związków, co utrudnia czytelnikowi zorientowanie się jaką grupę związków autorka omawia

Uwaga do *Wyniki i dyskusja* – powinny być one opisywane w pierwszej osobie gdyż są to wyniki własne doktorantki, a opis eksperymentów w stronie biernej

Strona 111 stwierdzenie *prowadzenie reakcji* powinno być zastąpione *warunki przeprowadzenia reakcji*

Strona 115 nie zaprezentowano struktury związku o numerze **5.2**. Związku tego nie udało się uzyskać podczas katalitycznego debenzoilowania związku **5.1f**. Nie jest jednak jasne czy wynikiem było obserwowanie nieprzereagowanego substratu, czy też w trakcie uwodornienia powstają produkty uboczne (zastosowany rozpuszczalnik to etanol lub octan etylu).

Strona 139 stwierdzenie *potraktowanie* nie jest precyzyjnym określeniem chemicznym czy doktorantka miała na myśli odparowanie czy ekstrakcję lub inny proces?

Strona 142 *Synteza tworzenia wiązania* – albo synteza albo tworzenie

Strona 172 punkt 2 „*ustalono najbardziej korzystne warunki syntezy*” należy podać jakie i jak prowadzono proces optymalizacji

Nie znalazłem także żadnych informacji, które świadczyłyby, że autorka podjęła próby ochrony prawnej otrzymanych wyników naukowych. Ponieważ otrzymane nowe związki posiadają potencjalne zastosowania biologiczne uważam, za zasadne podjęcie kroków w celu uzyskania ochrony prawnej opracowanych rozwiązań w postaci zgłoszenia patentowego. Bardzo proszę o wyjaśnienie i ustosunkowanie się do tej uwagi.

Na tym etapie oceny proszę również o odpowiedź na następujące pytania merytoryczne:

1. w rozprawie doktorskiej pokazała Pani bardzo wydajny sposób funkcjonalizacji powierzchni nanorurek węglowych za pomocą perfluorowanych α -aminofosfonianów wskazując jednocześnie, że otrzymany układ może być wykorzystany w transporcie leków do komórek nowotworowych. Rozwój nośników w transporcie do jądrowym jest obecnie ważnym elementem prac naukowych, jednakże warunkiem koniecznym jest niska toksyczność nośnika. Bardzo proszę o skomentowanie toksyczności nanostruktur wykonanych z nanorurek węglowych.
2. na stronie 92 i 93 doktorantka opisuje problemy z katalitycznym uwodornieniem związku **4.3** do związku **4.4**. W konsekwencji decyduje się na alternatywne rozwiązanie ponieważ podczas katalitycznego uwodornienia powstaje cała seria produktów ubocznych. Produkty te związane są z zastosowaniem jako medium reakcji alkoholu etylowego lub octanu etylu. Czy według autorki zmiana rozpuszczalnika na rozpuszczalnik aprotyczny spowoduje eliminację produktów ubocznych?

Szeroka i ambitna tematyka badawcza, jak również rzetelne przedstawienie uzyskanych wyników syntetycznych oraz analitycznych zaprezentowanych w dysertacji pozwala mi stwierdzić, że Pani mgr Agata Maria Pawłowska w pełni osiągnęła poziom naukowy wymagany do uzyskania tytułu naukowego doktora nauk chemicznych. Po lekturze rozprawy jestem przekonany, że jest ona sprawnym eksperymentatorem który rozumie potrzebę multidyscyplinarnego podejścia do rozwiązywania problemu naukowego.

Za najważniejsze oryginalne osiągnięcia naukowe Autorki uznaję:

1. opracowanie szlaku syntetycznego i przeprowadzenie syntezy fluorowanych fosfonianowych analogów fenyloglicyny (związki **4.13**) oraz homofenyloalaniny (związki **4.16**)
2. przeprowadzenie badań nad aromatyczną substytucją nukleofilową w perfluorowanym aromatycznym pierścieniu fosfonianowych analogach aminokwasów (określenie wpływu rozpuszczalnika w tych reakcjach)
3. opracowanie metody dealkilacji w celu otrzymania fluorowanych kwasów fosfoniowych
4. synteza fosfonianowych analogów dipeptydów oraz identyfikacja i wyjaśnienie mechanizmu tworzenia ubocznego produktu cyklicznego **5.20**
5. Przeprowadzenie niekwalencyjnej i kowalencyjnej funkcjonalizacji powierzchni nanorurki węglowej za pomocą fluorowanych α -aminofosfonianów
6. wykazanie, że fluorowane α -aminofosfoniany wykazują aktywność cytotoksyczną oraz niską toksyczność co powoduje że są dobrymi kandydatami do dalszych badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi.

Na podstawie wykonanej analizy przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej pod tytułem „*Synteza, reaktywność oraz zastosowanie fluorowanych fosfonianowych analogów homocysteiny i fenyloalaniny*” autorstwa pani mgr Agaty Marii Pawłowskiej stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym* (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z póź. zm.). Należy zaznaczyć, że została przygotowywana pod opieką promotora, i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie chemii organicznej oraz nanochemii. Kandydatka zaprezentowała szeroką wiedzę teoretyczną w dziedzinie oraz praktyczne umiejętności przeprowadzając opisane w rozprawie syntezy organiczne, funkcjonalizację nanorurek oraz analizę cytotoksyczności, co poprawnie udokumentowała. W związku z

powyższym wniosku do Rady Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W opinii recenzenta praca doktorska pani mgr Agaty Marii Pawłowskiej jest opracowaniem wyróżniającym się ze względu na szeroki zakres tematyczny oraz wykorzystanie nanotechnologii. Multidyscyplinarność podejścia do tematu oraz duża determinacja i pomysłowość autorki w rozwiązywaniu problemów naukowych skłania mnie do złożenia wniosku do Rady Wydziału Chemii UAM o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Z poważaniem

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcin Chmielewski". The signature is written in a cursive style with a large initial 'M'.

dr hab. Marcin K. Chmielewski