



Poznań, 9 października, 2019 r.

Ocena rozprawy doktorskiej zatytułowanej

Synteza supramolekularna, struktura i charakterystyka fizykochemiczna wybranych związków o właściwościach farmakologicznych

w związku z postępowaniem prowadzonym na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej o nadanie stopnia naukowego doktora pani mgr inż. Dorocie Pogodzie

Formalna charakterystyka rozprawy. Praca doktorska pani mgr inż. Doroty Pogody została wykonana w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Strukturalnej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem pani profesor Venety Videnowej-Adrabińskiej oraz w grupie badawczej profesora Michaela Zaworotko na Uniwersytecie w Limerick, Irlandia. Przedstawiona została w języku polskim w formie książki w miękkiej oprawie liczącej 257 stron. Składa się z dziewięciu rozdziałów, z których trzy pierwsze zawierają wstęp, cel pracy oraz opis stosowanej aparatury badawczej i programów komputerowych, a ostatni zawiera podsumowanie. Pozostałych pięć rozdziałów poświęconych jest opisowi badań własnych Doktorantki, dotyczących nowych postaci krystalicznych dobrze znanych medykamentów i związków biologicznie czynnych, a mianowicie 5-nitrofurazonu, kwasu kynureninowego, kokryształów sulfametazyny, sulfatiazolu i resweratrolu jak też związków będących potencjalnymi kandydatami na leki uzyskanych na drodze reakcji w ciele stałym. Praca zawiera również spis treści oraz wykaz tabel i rysunków. Każdy z rozdziałów posiada osobną bibliografię, poprzedzony jest krótkim wstępem charakteryzującym omawiany związek i zwięzłym podsumowaniem. Na moją prośbę Autorka dostarczyła dane krystalograficzne w formie zbiorów cif. Zazwyczaj są one dołączane do rozpraw doktorskich na płycie CD, by ułatwić recenzentowi ocenę jakości prezentowanych wyników, szczególnie tych niepublikowanych. Nie znalazłam również dodatku do pracy doktorskiej, na który Autorka powołuje się na stronie 87, streszczenia pracy w języku angielskim oraz informacji o dorobku naukowym Doktorantki. Zdołałam dotrzeć do dwóch publikacji mgr inż. Doroty Pogody, których treść pokrywa się z materiałem zawartym w rozprawie doktorskiej. Są to publikacje w sekcjach B i C *Acta Crystallographica*. Pierwsza z nich charakteryzuje trzy formy polimorficzne 5-nitrofurazonu, druga sześć nowych form krystalicznych kwasu kynureninowego. Wnioskuje stąd, że reszta prezentowanego materiału nie została jeszcze ogłoszona drukiem.

Ocena merytoryczna. Tworzenie kryształów wieloskładnikowych, w tym kokryształów, wzbudza szerokie zainteresowanie w kręgach naukowych i przemysłowych. Wynika to przede wszystkim z możliwości modyfikowania na tej drodze właściwości fizykochemicznych substancji interesujących z pragmatycznego punktu widzenia. Stosowanie współkryształacji jako metody otrzymywania nowych form substancji jest szczególnie popularne przy poszukiwaniu nietradycyjnych postaci leku. Kokryształy farmaceutyczne służą do modyfikowania farmakodynamicznych właściwości kokryształizującej substancji leczniczej. Możliwa jest znaczna poprawa jej rozpuszczalności, stabilności, jak również biodostępności poprzez współkryształację z tzw. koformerem. Ponadto, kontrolowana przez tworzenie kokryształów synteza mechanochemiczna pozwala na 'uprawianie' tzw. zielonej chemii czyli przeprowadzanie syntez bez rozpuszczalnika organicznego lub w obecności śladowych jego ilości. Przy otrzymywaniu kokryształów korzysta się z reguł wyprowadzonych przez inżynierię krystaliczną, a

dotyczących sposobu oddziaływania określonych grup funkcyjnych w kryształach w warunkach konkurencji.

Tym właśnie zagadnieniom poświęcona jest recenzowana rozprawa doktorska pani mgr inż. Doroty Pogody, co oznacza, że zaprezentowana przez nią tematyka badawcza jest bardzo aktualna. Wymaga ona ugruntowanej wiedzy i zrozumienia zagadnień związanych z rodzajem oddziaływań międzycząsteczkowych i hierarchii tych oddziaływań, by móc, choć w przybliżeniu, przewidzieć rodzaj powstających produktów reakcji w ciele stałym.

Rozdział I, zatytułowany *Wprowadzenie*, jest poświęcony tym zagadnieniom, które ściśle wiążą się z częścią badań własnych i oparty jest na dobrze dobranych 132 pozycjach literaturowych. Autorka prezentuje tutaj strategie użyteczne przy projektowaniu kokryształów oraz procedury stosowane przy kontrolowanej przez tworzenie kokryształów syntezie w ciele stałym i porusza szereg zagadnień związanych z występowaniem zjawiska polimorfizmu i jego konsekwencjami. Przygotowanie tego rozdziału wymagało od Doktorantki znajomości obszernej literatury z tej dziedziny.

Rozdział II przedstawia cel pracy i omawia zadania badawcze jemu służące. Jak się z niego dowiadujemy, głównym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była synteza supramolekularna nowych kokryształów farmaceutycznych oraz ich charakterystyka spektroskopowa, termiczna i strukturalna. Ponieważ procesowi syntezy w warunkach odmiennych od klasycznych nieuchronnie towarzyszy zjawisko otrzymywania nowych form krystalicznych substratów, Autorka miała również za zadanie ich identyfikację oraz możliwie pełną charakterystykę.

Realizacja tak określonego celu przebiegała wieloetapowo. Rozpoczął ją proces projektowania syntezy supramolekularnej, poprzedzony przeglądem danych strukturalnych zgromadzonych w krystalograficznej bazie danych CSD. Przegląd ten miał na celu przypisanie do danej cząsteczki preferowanych przez nią oddziaływań i ustalenie populacji motywów strukturalnych tworzonych z jej udziałem. Analiza dotyczyła również oszacowania prawdopodobieństwa tworzenia solwatu lub hydratu, poprzez porównanie skłonności do oddziaływań między tymi samymi cząsteczkami ze skłonnością do oddziaływań pomiędzy różnymi cząsteczkami, na przykład między składnikiem aktywnym a potencjalnymi koformerami. Z kolei analiza labilności konformacyjnej cząsteczki, możliwości występowania tautomerii i zdolności do tworzenia różnorodnych syntonów supramolekularnych pozwalała oszacować prawdopodobieństwo występowania odmian polimorficznych. Kolejny etap prac polegał na przeprowadzeniu zaplanowanych syntez, identyfikacji produktów i ich charakterystyce metodami fizykochemicznymi, a w niektórych przypadkach określeniu aktywności biologicznej otrzymanych substancji.

Rozdział III zatytułowany „Metody badawcze” miał, jak miemam, zapoznać czytelnika z metodami fizykochemicznymi użytecznymi w studiach nad strukturą i właściwościami substancji w fazie stałej. Opis ten jednak sprowadza się do specyfikacji aparatury pomiarowej i używanych programów komputerowych, bez omówienia zasad, na których opiera się ich działanie oraz celu i warunków stosowania. Szczególnie w przypadku analizy rentgenowskiej monokryształów brak jest informacji wymaganych w publikacjach zawierających struktury krystaliczne, na przykład brak jest opisu procedury stosowanej w celu lokalizacji atomów wodoru i sposobu ich traktowania w procesie udokładniania. Ponadto brak jest wzmianki o stosowaniu programu *CrystalExplorer* do analizy oddziaływań międzycząsteczkowych.

Rozdziały IV, V i VII dotyczą tworzenia kokryształów przez znane leki tj. sulfametazyne i sulfatiazol oraz przez naturalny polifenol, resweratrol. W wyniku badań przesiewowych prowadzonych w kierunku uzyskania kokryształów sulfametazyne ze związkami zawierającymi grupę karboksylową, aminową oraz fosfonową Autorka otrzymała 10 rodzajów kokryształów, z których dziewięć poddała rentgenograficznym badaniom strukturalnym. Analiza sposobu upakowania cząsteczek w kryształach i rodzaju syntonów supramolekularnych tworzonych z udziałem wiązań wodorowych została przeprowadzona rzetelnie. To co zwraca uwagę krystalografa, a nie zostało w sposób wyraźny

podkreślone w rozprawie to fakt, że sulfametazyna z niektórymi pochodnymi pirydyny tworzy kryształy niecentrosymetryczne (grupa przestrzenna Cc), a nawet chiralne (grupa przestrzenna $P2_1$). Doktorantka nie podaje wartości parametrów Flacka, które wskazują na prawidłowość wyznaczenia absolutnej struktury tych kryształów. Interesującym zagadnieniem poruszonym w rozdziale IV jest występowanie dwóch form tautomerycznych sulfametazyny w kokryształach jakie tworzy z 4,4'-azopirydyną, zjawisko nienowe, ale rzadkie.

Analiza struktury czterech kokryształów tworzonych przez sulfatiazol, omawianych w rozdziale V, pozwoliła określić wpływ modyfikacji sieci krystalicznej na rozpuszczalność nowo otrzymanych substancji. Aż siedmiokrotną poprawę rozpuszczalności zaobserwowała Doktorantka dla kokryształu sulfatiazolu z kwasem 5-nitroizoftalowym. Ten wzrost tłumaczy Autorka przeciwstawiając trójwymiarową sieć cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi w kryształach sulfatiazolu warstwowemu ułożeniu tych cząsteczek w kokryształach z kwasem 5-nitroizoftalowym. Jak tłumaczy, rozerwanie wiązań wodorowych w warstwie może wymagać mniejszej energii niż w sieci trójwymiarowej. Autorka zapomniała jednak wspomnieć, którą z pięciu znanych form polimorficznych sulfatiazolu zastosowała jako wzorcową i jakiego medium używała w badaniach rozpuszczalności. Ponadto, w tym rozdziale brak jest tabel z danymi krystalograficznymi dla omawianych tu czterech kokryształów tworzonych przez sulfatiazol.

Jako koformery dla resweratrolu Doktorantka wybrała związki zawierające atom azotu w pierścieniu aromatycznym. W efekcie otrzymała sześć rodzajów kokryształów, a mianowicie z bipirydyną, 4,4'-winylobipirydyną, dwie formy kokryształów z 4,4'-azopirydyną oraz kokryształy z aktywnymi biologicznie izoniazydem i fenazyką. Wybór koformery nie był do końca trafny, jako że dane strukturalne dotyczące kokryształów resweratrolu z bipirydyną i fenazyką zostały już wcześniej opublikowane i zdeponowane w bazie CSD przez innych badaczy, natomiast dla kokryształów z izoniazydem zostały ogłoszone drukiem w lipcu tego roku (*Cryst. Growth Des.* 2019, 19, 5029–5036). Co ciekawe, wspomniany artykuł skupia się na analizie zmian właściwości farmakologicznych izoniazydu, podczas gdy Doktorantkę interesują głównie zmiany w strukturze i właściwościach resweratrolu. Fakt opublikowania przez innych autorów części rezultatów uzyskanych przez Doktorantkę jest dowodem na aktualność tematyki, którą się zajmuje i powinien skłonić ją do jak najszybszego ogłoszenia drukiem pozostałych wyników. Muszę przyznać, że porównanie rezultatów uzyskanych przez Doktorantkę z już opublikowanymi okazało się skomplikowane ze względu na liczne błędy zawarte w tabeli 7.1. Na przykład z niezrozumiałych względów w wielu miejscach cyfry 6 zastąpiły cyfry 3. Tylko dzięki dostępowi do zbiorów cif byłam w stanie zdiagnozować problem. Zwracam również uwagę, że w kokryształach z bipirydyną zdefiniowana przez Autorkę podstawowa jednostka strukturalna zawiera dwie cząsteczki resweratrolu i trzy cząsteczki bipirydyny i wobec tego liczba takich jednostek w komórce elementarnej wynosi 2, a nie 4 jak podano w tabeli 7.1. Nie uszedł mojej uwadze nieprawidłowy wzór sumaryczny dla kokryształu resweratrolu z izoniazydem umieszczony w tejże tabeli.

Rozdział VI dotyczy szczególnego rodzaju syntezy w ciele stałym, syntezy inicjowanej tworzeniem kokryształów [*ang.* Cocrystal Controlled Solid-State Synthesis (C^3S^3)] Doktorantka uzyskała na tej drodze szereg imidów i amidów w reakcji kondensacji bezwodnika kwasowego z aminą, stosując trzy różne cykliczne bezwodniki oraz siedem pierwszorzędowych amin. Reakcja mechanochemiczna była inicjowana wzajemnym zbliżeniem reagentów do siebie w wyniku oddziaływań supramolekularnych. Utworzone kokryształy były następnie podgrzewane w celu przeprowadzenia reakcji kondensacji. Reakcje prowadzono zarówno bez użycia rozpuszczalnika jak i w obecności niewielkich jego ilości. Do kontroli przebiegu syntezy Doktorantka stosowała dyfraktometrię proszkową, spektroskopię IR i skaningową kalorymetrię różnicową (DSC). Ogółem otrzymała ona jedenaście związków imidowych, w tym osiem dotychczas nieznanymi, których wzory strukturalne przedstawiła w tabeli 6.1. Natomiast dla pięciu związków amidowych brak jest analogicznego zestawienia. Dyfraktogramy, zwane przez Autorkę

teoretycznymi, dla próbek oznaczonych skrótowo jako 3,4-Pyr-pPhen, 3,4-Pyr-IMD, NAPH-5QUIN oraz PYM-5QUIN zostały wygenerowane na podstawie znajomości struktury krystalicznej tych związków. Z kolei z zestawienia w tabeli 6.1. wynika, że struktury te nie zostały dotychczas zdeponowane w bazie CSD. Oznacza to, że Autorka musiała mieć dostęp do tych niepublikowanych wyników i w takim razie powinna koniecznie podać ich źródło. Większość otrzymanych związków została poddana badaniom *in vitro* na aktywność przeciwnowotworową oraz przeciwbakteryjną. W ostatecznym wyniku pięć z nich zakwalifikowało się do testów na wielolekoopornych szczepach szpitalnych *E. coli*.

Licznie występujące w pracy błędy literowe, nad którymi w innych rozdziałach można było przejść do porządku dziennego, w Rozdziale VI są źródłem poważnych trudności w percepcji prezentowanego materiału. Dzieje się tak dlatego, że 'literówki' dotyczą identyfikatorów. I tak skrótowi IMD na rysunku 6.2 odpowiada w tabeli 6.1 skrót ISD, a odniesienia do linii komórkowych L929 i L292 w tekście i w podpisach pod rysunkami są zupełnie przypadkowe. Na przykład, aby być w zgodzie z podpisem pod rysunkiem 6.33, linia komórek prawidłowych na stronie 156 powinna być oznaczona jako L929, a nie L292.

Za wyjątkiem badań biologicznych, prace doświadczalne opisane w Rozdziale VI były wykonywane przez Doktorantkę podczas stażu w grupie badawczej prof. Michaela Zaworotko. Synteza określana skrótem C³S³ należy do najnowszych osiągnięć profesora i jego podopiecznych.

Rozdział VIII poświęcony jest omówieniu zjawiska występowania 5-nitrofurazonu oraz kwasu kynureninowego w różnych formach krystalicznych. Omawiane są struktury trzech polimorfów 5-nitrofurazonu, dwie formy polimorficzne monohydratu kwasu kynureninowego oraz struktura jego solwatu z DMSO. Szczegółowo analizowana jest struktura cząsteczki, tj. konformacja i forma tautomeryczna występująca w ciele stałym oraz sposób upakowania cząsteczek w kryształach z uwzględnieniem syntonów supramolekularnych tworzonych za pomocą wiązań wodorowych. Ponadto szacowany jest procentowy udział poszczególnych rodzajów oddziaływań na podstawie analizy powierzchni Hirshfelda przy pomocy programu *CrystalExplorer*. Zawarty w tym rozdziale materiał badawczy został już opublikowany w specjalistycznych czasopismach międzynarodowej Unii Krystalografii, tj. *Acta Cryst. B* i *Acta Cryst. C*.

Ogółem, recenzowana praca przedstawia syntezę i strukturę krystaliczną 19 kokryształów, dwóch nowych odmian polimorficznych 5-nitrofurazonu i dwóch nowych form krystalicznych kwasu kynureninowego oraz syntezę w ciele stałym jedenastu związków imidowych (w tym osiem nowych) i pięciu amidowych. Substancje otrzymane na tej drodze poddane zostały badaniom na aktywność cytotoksyczną i przeciwdrobnoustrojową, a wyniki dla pięciu z nich są obiecujące. Zgromadzony został bardzo obszerny materiał doświadczalny, który z pewnością mógłby posłużyć do przygotowania przynajmniej jeszcze dwóch publikacji w fachowych czasopismach.

W przedstawionej rozprawie na podkreślenie zasługują:

1. Otrzymanie nowych substancji, w skład których wchodzi specyfiki stosowane w przemyśle farmaceutycznym, przez kokryształizację z odpowiednim dobranym koformerem i ich charakterystyka strukturalna.
2. Przeprowadzenie mechanochemicznej syntezy cyklicznych imidów i zbadanie ich aktywności cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej.
3. Otrzymanie nowych form krystalicznych 5-nitrofurazonu i kwasu kynureninowego i ich charakterystyka.
4. Precyzyjne określenie składu fazowego komercyjnego kwasu kynureninowego.

Uwagi Krytyczne.

1. Treści pisane łamaną polszczyzną są traktowane w poczcie elektronicznej jako podejrzane. Podobną ostrożność budzą rozprawy naukowe pisane przez autorów w ich ojczystym języku bez zachowania reguł gramatycznych. Dotyczy to rozprawy doktorskiej przygotowanej przez

mgr inż. Dorotę Pogodę. Pozwolę sobie przytoczyć tylko dwa przykłady, a mianowicie ze strony 124: 'Zamierzone do otrzymania związku imidowe nie posiadają struktury krystalicznej w krystalograficznej bazie Cambridge, co więcej osiem zaprojektowanych związków są obecnie nieznanne w literaturze' i ze strony 239: 'trzy grupy funkcyjne będące sztywne'. Zastrzeżenia dotyczą również wyglądu pracy. Podpisy pod rysunkami są często przeniesione na kolejną stronę, a można było tego uniknąć stosując przy ich tworzeniu czcionkę mniejszych rozmiarów. Razi również formatowanie tabel, w których pojedyncze litery nagłówek opisujących zawartość kolumny przeniesione są do kolejnego wiersza. Ponadto zdarzają się fragmenty zdań wykreślone programem edytorskim, ale widoczne na wydruku, etc., etc.

2. W związku z tym co napisałam powyżej proszę o wyjaśnienie co znaczy stwierdzenie na str. 239:., że 'helisy w formie I (synton a) oraz w formie III (synton c) są tworzone za pomocą cząsteczek kwasu' sugerujące, że synton b nie jest tworzony przez cząsteczki kwasu i co właściwie Autorka chciała w tym fragmencie powiedzieć.
3. Za niepoprawne uznaje się używanie określenia polimorf w odniesieniu do kryształu o innym składzie niż substancja wyjściowa.
4. W odniesieniu do atomu nie używamy sformułowań 'wodór', 'tlen', ale 'atom wodoru', 'atom tlenu'.
5. Czy w mniemaniu Autorki rzeczownik 'synteza' odnosi się do substratów czy do produktu reakcji? W rozprawie jest on często stosowany w znaczeniu 'reakcja'.
6. Niektóre sformułowania są wierną kopią angielskich zwrotów i w tej formie nie są używane w języku polskim. I tak zamiast wyrażen 'inwersyjnie związane' (*ang. inversion related*) lub 'będące w relacji inwersji' używamy określeń 'przekształcone w środku symetrii', albo 'przekształcone przez środek symetrii (inwersję)'; podobnie zamiast 'komórka asymetryczna' używamy sformułowania 'asymetryczna część komórki elementarnej'; a zamiast ' $\pi\cdots\pi$ oddziaływania' stosujemy określenie 'oddziaływania typu $\pi\cdots\pi$ '.

Podsumowanie. Na zakończenie chciałabym podkreślić, że mimo uwag krytycznych, często dotyczących spraw edytorskich, moja ocena rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Doroty Pogody jest pozytywna. Materiał doświadczalny zgromadzony w pracy jest obszerny i obejmuje różnorodne techniki badawcze. Rozprawa pokazuje bogactwo związków uzyskiwanych przy próbach kokryształizacji wybranych farmaceutyków z cząsteczkami odpowiednio dobranego koformera i pogłębia ogólną wiedzę o sposobie ich wzajemnego rozpoznawania i oddziaływania. Pozwala też na oszacowanie ryzyka wystąpienia wielości form krystalicznych badanego związku wskutek zmian warunków krystalizacji.

Doktorantka wykazała się umiejętnościami z zakresu syntezy w ciele stałym, interpretacji wyników badań fizykochemicznych metodami TG-DTA, DSC, spektroskopii IR, ramanowskiej, dyfraktometrii proszkowej oraz badań strukturalnych monokryształów. Dowiodła, iż posiada szeroką wiedzę z zakresu chemii supramolekularnej i krystalografii. Dlatego też stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Doroty Pogody spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. i na tej podstawie wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Doroty Pogody do publicznej obrony.