



Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Prof. dr hab. inż. Tomasz Janecki

Łódź, 20.03.2024

Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Ul. Żeromskiego 116

90-924 Łódź

Tel: (+42) 631-32-20

E-mail: tomasz.janecki@p.lodz.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Olejkowskiej
pt. „Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowaniu
innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności
antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL)”**

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska magister Patrycji Olejkowskiej zrealizowana została w ramach doktoratu wdrożeniowego, w oparciu o umowę między Patrycją Olejkowską, firmą Celon Pharma S.A. i Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Jacek Ścianowski z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a promotorem pomocniczym dr Abdellah Yamani z firmy Celon Pharma S.A.

Rozprawa dotyczy poszukiwania potencjalnych nowych leków na białaczkę limfoblastyczną. Białaczka to rodzaj nowotworu krwi lub szpiku kostnego, charakteryzujący się klonalną ekspansją pojedynczej komórki na różnych etapach rozwoju układu limfatyczno-hemopoetycznego. Obecnie dostępna jest ogromna liczba chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu białaczki, ale większość z nich uszkadza, w mniejszym lub większym stopniu, również prawidłowe komórki. Dlatego też identyfikacja nowych leków, które mogą być specyficznie i preferencyjnie ukierunkowane na komórki nowotworowe bez wpływu na normalne komórki krwiotwórcze, może być obiecującym podejściem w leczeniu białaczki.

W ramach przedstawionej rozprawy Doktorantka zaprojektowała i otrzymała bibliotekę 120 niskocząsteczkowych związków, które zostały następnie przebadane jako potencjalne inhibitory kinazy MerTK. Ostatecznym celem było znalezienie leku o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL), który charakteryzowałby się wysoką doustną biodostępnością, korzystnym profilem farmakologicznym i niską toksycznością. Wiele wysiłku Doktorantka poświęciła też optymalizacji metody syntezy zaprojektowanych związków przy wykorzystaniu technologii chemii przepływowej i mikrofalowej. Jako związek modelowy do zaprojektowania nowych analogów wybrany został znany inhibitor MRX2844, zawierający w swojej strukturze szkielet pirolopirymidyny.

Ocena formalna

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter badawczo-wdrożeniowy i zawiera 282 strony. Zbudowana jest w sposób klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich i obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis treści, wstęp z zarysowanym celem pracy, część literaturową przedstawiającą aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (76 stron), wyniki badań własnych (71 stron), podsumowanie badań własnych (6 stron) oraz część doświadczalną zawierającą procedury syntetyczne i analizę fizykochemiczną otrzymanych pochodnych (101 stron). Uzupełnieniem treści rozprawy jest spis literatury liczący 149 pozycji. Oddzielny załącznik przedstawia dorobek naukowy Doktorantki, na który składają się trzy publikacje w czasopiśmie z tzw. „listy filadelfijskiej” oraz pięć prezentacji posterowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorantka była też wykonawcą w trzech grantach wydziałowych.

Podsumowując uważam, że pod względem formalnym sposób prezentacji rozprawy jest przejrzysty, a zawartość merytoryczna poszczególnych części poprawnie opisana, co bardzo ułatwia ich czytanie.

Ocena merytoryczna

Część literaturowa

Podstawowym celem rozprawy było opracowanie oraz optymalizacja metody syntezy biblioteki analogów znanego inhibitora kinazy MerTK o symbolu MRX2844, ocena aktywności antynowotworowej otrzymanych związków przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej oraz wybór struktur wiodących do dalszych badań. Z tego względu część literaturowa rozpoczyna się omówieniem rodzajów białaczek, ich występowaniem, objawami oraz diagnostyką. Omówione są też czynniki prognostyczne wpływające na szansę wyleczenia ostrej białaczki limfoblastycznej, które brane są pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o sposobie i intensywności leczenia oraz rodzaje stosowanych chemioterapii. W następnym rozdziale opisane są rodzaje receptorowych kinaz tyrozynowych oraz profile farmaceutyczne poznanych dotąd inhibitorów kinaz Mer. Osobny fragment części literaturowej poświęcony jest podstawom teoretycznym, zaletom oraz praktycznemu wykorzystaniu technologii chemii przepływowej FLOW oraz technologii mikrofalowej, które Doktorantka stosowała w celu optymalizacji metody syntezy inhibitora kinazy MerTK, MRX2844. Dwa końcowe rozdziały opisują mechanizm reakcji sprzęgania Sonogashiry i reakcji sprzęgania Suzuki, które wykorzystane zostały w kluczowym etapie syntezy biblioteki analogów inhibitora kinazy MerTK. W mojej ocenie część literaturowa dobrze wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej omawianych w rozprawie zagadnień i bardzo dobrze świadczy o przygotowaniu Doktorantki do realizacji zamierzonego celu badań.

Lektura tego fragmentu rozprawy nasuwa jednak kilka uwag krytycznych.

- 1) Umieszczanie w wykazie skrótów nazw powszechnie znanych związków, (np. Br – brom czy H₂O – woda) nie wydaje się potrzebne. Błędem jest określenie skrótu *tert*-BuOH jako *tert*-butanol a *i*PrOH jako izopropanol. Nie należy mieszać

nomenklatury zwyczajowej z systematyczną. Poza tym, nie ma węgłowodoru o nazwie tertbutan. Prawidłowa nazwa zwyczajowa dla wzoru *tert*-BuOH to alkohol *tert*-butylowy, a systematyczna 2-metylopropan-2-ol.

- 2) We wstępie, jak i w części literaturowej zdarzają się niezręczne sformułowania. Czy analiza opublikowanych patentów może „zagrozić zaprojektowaniu struktury nowego inhibitora MerTK” (str. 14)? Czy można „przyspieszyć plan pracy” (str. 15)?
- 3) Numery związków, dla których nie podaje się pełnej nazwy systematycznej, nie powinny być umieszczane w nawiasie (np. str. 31).
- 4) Schemat 2 (str. 67) powinien być raczej nazwany rysunkiem.

Badania własne

Badania własne przedstawione zostały na kolejnych 71 stronach i, nie wiem dlaczego, zatytułowane jako „Część eksperymentalna”. W rozdziale najpierw opisano jak zaprojektowano bibliotekę 120 struktur, jako potencjalnych inhibitorów kinazy MerTK. Jako związek modelowy do zaprojektowania nowych analogów wybrany został znany inhibitor MRX2844. Do selekcji wykorzystane zostały metody bioinformatyczne *in silico* a pod uwagę wzięto pożądane właściwości fizykochemiczne analogów i ich interakcję z białkiem MerTK. Następnie przeprowadzono syntezę wybranych 120 związków, wykorzystując ścieżkę syntetyczną opisaną dla związku wzorcowego MRX2843. Otrzymane analogi miały szkielet pirymidyny podstawiony w pozycji 2, 4 i 5 (analog 167) lub szkielet 5-(*trans*-4-hydroksycykloheksylo)pirolopirymidyny podstawiony różnymi podstawnikami heterocyklicznymi, alkilowymi, cykloalkilowymi czy aryłowymi w pozycjach 2 i 5 (wszystkie pozostałe). Ich synteza składała się z ośmiu etapów, a kluczowe z nich to sprzęganie Sonogashiry, reakcja aminowania i sprzęganie Suzuki. Dla modyfikacji struktury syntezowanych analogów wykorzystano reakcję nukleofilowego podstawienia chloru w 5-bromo-2-chloro-7-(*trans*-4-hydroksycykloheksylo)pirolopirymidynach różnymi aminami oraz reakcję sprzęgania Suzuki otrzymanych 2-amio-5-bromo-7-(*trans*-4-hydroksycykloheksylo)pirolopirymidyn z różnymi kwasami lub estrami boronowymi. Postęp prowadzonych reakcji jak i oczyszczanie końcowych związków prowadzono metodami chromatograficznymi i scharakteryzowano rejestrując ich widma ¹H i ¹³C NMR oraz przy pomocy chromatografii cieczerwnej sprzężonej ze spektrometrem masowym. Czystość wszystkich otrzymanych związków wynosiła powyżej 90%.

Po przeprowadzeniu wstępnych badań biologicznych otrzymanych analogów wyłoniono trzy związki, o numerach 89, 108 i 167, mające największe powinowactwo do kinazy Mer i najbardziej optymalne właściwości fizykochemiczne. Wybrane związki poddawane są dalszym testom biologicznym na ich aktywność metaboliczną, badaniom fizykochemicznym, stabilnościowym oraz testom na komórkach i zwierzętach. Z powodu wybuchu pandemii, który miał miejsce w trakcie realizacji doktoratu, nie udało się Doktorantce do tej pory wyłonić ostatecznego związku wiodącego i przeprowadzić na nim badań toksykologicznych oraz klinicznych. Z tego powodu Doktorantka przeprowadziła optymalizację syntezy związku wzorcowego MRX2843 zamiast, wybranego na podstawie odpowiednich testów, ostatecznego związku wiodącego. Optymalizacja to polegała na wykorzystaniu technologii mikrofalowej oraz przepływowej w poszczególnych etapach

syntezy i zmianie różnych parametrów reakcji, takich jak temperatura, czas reakcji, rodzaj i ilość rozpuszczalnika czy stechiometria substratów. Badania te wykazały szczególną użyteczność syntetyzatora mikrofalowego, który pozwalał na bardzo znaczące skrócenie czasu syntezy. Optymalizacja ta będzie mogła zostać wykorzystana przy syntezie pochodnych związku referencyjnego.

Uwagi krytyczne i dyskusyjne

- 1) Związek o numerze 47 to kluczowy związek używany przy syntezie analogów, w reakcji aminowania, do wprowadzania modyfikacji w pozycji 2. Od związku 44, który występuje w Schemacie 8 (str. 87) przedstawiającym ścieżkę syntezy związku wzorcowego, różni się tym, że w pozycji 5 ma atom bromu zamiast jodu. W pracy nie znalazłem komentarza skąd ta zmiana w stosunku do ścieżki syntezy związku wzorcowego MRX2843?
- 2) Na stronie 103 Schemat 2 powinien mieć numer 8. Na tej samej stronie: Czy dziedzina nauki może być zależna od czasu?
- 3) Opisy procedury eksperymentalnej i charakterystyka związków 40 – 43 i 47 powtarzane są zarówno w badaniach własnych jak i części eksperymentalnej. Nie sądzę, żeby takie powtórzenia były potrzebne.
- 4) Jak można wytłumaczyć to, że w optymalizacji ilości dodawanego katalizatora w reakcji sprzęgania Sonogashiry (str. 115, Tabela 21), przy innych parametrach takich samych, stopień konwersji substratu wynosił po 30 minutach 49% a po 40 minutach 0%?
- 5) Czy przy badaniach optymalizacyjnych wyznaczenie stopnia konwersji jest wystarczające dla oceny efektywności reakcji? Może się przecież zdarzyć, że część substratu nie zostanie przekształcona w produkt, a ulegnie np. rozkładowi czy innej przemianie.
- 6) W wielu optymalizacjach (np. przy optymalizacji reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego, str. 105) stopień konwersji w różnych eksperymentach różni często zaledwie o dziesiąte czy nawet setne części procenta. Czy w takim przypadku można jednoznacznie wybrać optymalną procedurę? Czy tak niewielkie różnice nie mogą mieścić się w granicach błędu pomiaru?

Część doświadczalna

Część doświadczalna rozprawy jest bardzo obszerna i zajmuje 101 stron. Są tam opisane procedury syntetyczne oraz wyniki badań fizykochemicznych wszystkich otrzymanych związków, w tym opisy widm ^1H i ^{13}C NMR oraz analiza masowa. Przepisy preparatywne są dokładne i pozwalają na precyzyjne odtworzenie procedur eksperymentalnych, w tym sposobu oczyszczania końcowych produktów. Jedynie w opisie preparatywnym syntezy pochodnych w reakcji sprzęgania Suzuki (str. 177) brak informacji kiedy używano kwasu boronowego a kiedy estru pinakolowego kwasu boronowego. Opisy widm NMR są zgodne z przyjętymi standardami. Szkoda jednak, że nie zawierają przypisań sygnałów do konkretnych protonów. Jak sądzę wynika to z trudności jakie napotkała Doktorantka przy szczegółowej interpretacji tych widm. Prosiłbym też o wyjaśnienie dlaczego w niektórych opisach widm ^1H i ^{13}C NMR nie zgadza się liczba protonów, np. związek 109 ma 35 protonów a w opisie widma jest wyszczególnionych 36 protonów. W

przypadku ciał stałych, w ich charakterystyce zabrakło mi też oznaczenia temperatur topnienia. Bardzo pomocne dla czytelnika są natomiast załączone struktury opisywanych związków. Część ta napisana jest przejrzysto, a Autorka trzyma się ustalonego schematu.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematyki rozprawy doktorskiej i w dużym stopniu zrealizowała założone cele badawcze, zgodnie ze standardami naukowymi. Rozprawa stanowi istotny i oryginalny wkład w poszukiwanie nowych związków o działaniu antynowotworowym przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej. Doktorantka zidentyfikowała nowe pochodne o szkielecie pirymidyny lub 5-(*trans*-4-hydroksycykloheksylo)pirolopirymidyny, które mogą być strukturami wiodącymi do dalszych badań. Przedstawione uwagi krytyczne bądź dyskusyjne nie wpływają w znaczący sposób na wartość naukową rozprawy. Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr. Patrycji Olejkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

