
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
Prof. dr hab. inż. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 4 marca 2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Olejkowskiej z tytułem

**„Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu
innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności
antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL)'
przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w ramach współpracy pomiędzy Uniwersytetem Mikołaja Kopernika a firmą farmaceutyczną Celon Pharma S.A. pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Ścianowskiego oraz dra Abdellaha Yamani, pełniącego rolę promotora pomocniczego. Zadaniem badawczym jakiego podjęła się mgr Patrycja Olejkowska było zaprojektowanie i synteza małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy Mer, otrzymanych poprzez modyfikację związku wiodącego MRX2843, analiza właściwości biologicznych, optymalizacja warunków syntezy poprzez zastosowanie technologii mikrofalowej i przepływowej, a następnie powiększenie skali w celu otrzymania wybranych pochodnych w ilościach niezbędnych do wykonania badań warunkujących możliwość wejście wyselekcjonowanych związków w pierwszą fazę badań klinicznych.

Kinaza tyrozynowa MER jest enzymem regulującym szlaki sygnałowe oraz ekspresję genów związanych z przeżywalnością komórek czy też fagocytozą komórek apoptotycznych. Ponieważ MER ulega nadekspresji w wielu nowotworach, w tym w ostrych białaczkach, enzym odpowiedzialny za ekspresję MER należy postrzegać jako ważny cel terapeutyczny w poszukiwaniu nowych substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Podjęte przez Doktorantkę w ramach doktoratu wdrożeniowego próby poszukiwania nowych skutecznych inhibitorów kinazy MER są zatem w pełni uzasadnione bieżącymi potrzebami współczesnej medycyny.

Dysertacja ma układ klasyczny, powszechnie przyjęty dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym i zawiera osiem głównych rozdziałów o tytułach odpowiednio: *Wykaz skrótów*, *Część literaturowa*, *Część eksperymentalna*, *Podsumowanie badań własnych*, *Część*

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

doświadczalna, Doktorat wdrożeniowy – wdrożenie do przemysłu oraz Literatura. To liczące 282 strony opracowanie autorstwa mgr Patrycji Olejkowskiej przygotowane zostało niezwykle starannie.

Opis prac przeprowadzonych w ramach studiów własnych poprzedzony został częścią literaturową, którą Doktorantka poświęciła charakterystyce białaczki, ze szczególnym uwzględnieniem ostrej białaczki limfoblastycznej, jej występowaniu, objawom, diagnozie, a także czynnikom prognostycznym oraz stosowanym schematom leczenia. W dalszej części opisano również receptorowe kinazy tyrozynowe oraz przykłady ich znanych inhibitorów. Ten liczący blisko 80 stron rozdział stanowi doskonałe wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą.

Zakres prac zostały jednoznacznie określony, a poszczególne cele badawcze racjonalnie zaplanowane. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Wyniki prac badawczych Doktorantka opisała w kolejnych podrozdziałach, a bardzo szczegółowa prezentacja wyników ujawnia istotny wkład Doktorantki w powstanie koncepcji badań, opracowaniu syntez zaprojektowanych związków, potwierdzeniu ich budowy i czystości, a także w interpretacji wyników badań biologicznych pozyskanych w ramach współpracy z poszczególnymi działami badawczo-rozwojowymi firmy Celon Pharma S.A.

Na wysoką ocenę zasługują racjonalne i w pełni przemślane działania podjęte w celu zaprojektowania serii nowych pochodnych w oparciu o strukturę wiodącą (związek MRX2843), a następnie wyselekcjonowanie związków, których syntezy podjęła się Doktorantka. W projektowaniu serii nowych inhibitorów kinazy tyrozynowej Mer wykorzystane zostały metody bioinformatyczne *in silico* w oparciu, o które wygenerowana została pokaźna liczba ok. 200 000 struktur, pochodnych MRX2843 zawierających układ pirymidyny i pirolopirymidyny, a po analizie danych takich jak masa molowa, logP, logD, akceptory/donory wiązań wodorowych i liczba wiązań rotacyjnych ograniczono ją do 2000 związków. Kolejnym krokiem zaprojektowanych badań było wykonanie dokowania do kryształu kinazy MerTK i wizualizacja poszczególnych związków w kieszeni aktywnej receptora. Analiza obliczonych parametrów fizykochemicznych, w tym rozpuszczalności, lipofilowości, stabilności chemicznej, pozwoliła na wyselekcjonowanie 120 cząsteczek, których syntezy Doktorantka podjęła się w ramach prac badawczych będących przedmiotem niniejszej rozprawy. Tak metodyczne podejście do projektowania związków, niepozostawiające miejsca na przypadkowość podejmowanych działań, zasługuje na wysokie uznanie. Uwzględniono modyfikacje struktury w miejscach grup funkcyjnych odpowiedzialnych za wiązanie z białkiem, nie pominięto również ważnego aspektu zapewnienia odpowiedniej rozpuszczalności potencjalnych inhibitorów.

Synteza zaprojektowanych związków wymagała opracowania odpowiednich ścieżek syntezy, funkcjonalizację odpowiednimi podstawnikami szkieletu pirymidyny i pirolopirymidyny, a w przypadku pochodnych pirolomirymidyny również uprzednią konstrukcją centralnego fragmentu heterocyklicznego. Z zadania opracowania dogodnych metod syntezy zaprojektowanych związków Doktorantka wywiązała się znakomicie. Pochodne pirymidyny uzyskane zostały poprzez zastosowanie sekwencji reakcji obejmującej aromatyczne podstawienie nukleofilowe przy C4 w 5-bromo-2,4-dichloropirymidynie, reakcję Suzuki przy C5, a następnie aromatyczne podstawienie nukleofilowe w pozycji C2. Synteza odpowiednich pochodnych pirolopirymidynowych również wykorzystująca jako substrat 5-bromo-2,4-dichloropirymidynę odbywała się zaś w wieloetapowej sekwencji reakcji obejmującej: aromatyczne aminowanie, sprzęganie Sonogashiry, cyklizacji, wprowadzenie grupy ochronnej na funkcje aktywne oraz bromowanie, aminowanie, sprzęganie Suzuki i usunięcie grupy ochronnej. Uzyskano pokaźną bibliotekę związków, która w dalszym rozwinięciu badań gwarantowała rzetelne przeprowadzenie analizy struktura-aktywność w badanej grupie połączeń.

Przedstawione dowody strukturalne nie budzą wątpliwości. Mgr Patrycja Olejkowska udowodniła, że doskonale opanowała warsztat syntetyczny, swobodnie posługuje się również nowoczesnymi metodami identyfikacji związków organicznych o złożonej strukturze. Opis widm NMR jest poprawny. Mam drobny komentarz dotyczący opisu widm ^{13}C NMR; Doktorantka precyzyjnie opisuje krotność wszystkich sygnałów w tym singletów, nie jest to oczywiście błędem, choć zwyczajowo w widmach ^{13}C NMR podajemy krotność jedynie tych sygnałów, dla których konieczne jest wskazanie stałej sprzężenia.

W ramach współprac z poszczególnymi działami badawczo-rozwojowymi firmy Celon Pharma S.A. określono aktywność hamującą otrzymanych związków względem kinazy Mer i wyznaczono wartości logP. Szkoda, że oprócz stabelaryzowania uzyskanych danych (str. 89–100) Doktorantka nie pokusiła się o choćby krótki komentarz/dyskusję wyników, tym bardziej, że do dalszych badań wyselekcjonowano trzy związki **89**, **108** i **167**, dla których uzyskane wartości IC_{50} nie były najniższe spośród wszystkich przedstawionych we wspomnianych tabelach. Wprawdzie Autorka dalej wyjaśnia, że wyselekcjonowane do dalszych badań związki wykazywały największe powinowactwo do kinazy Mer i najbardziej optymalne właściwości fizykochemiczne (70% strukturalnego podobieństwa w stosunku do związku referencyjnego), nie mniej jednak dość lakoniczny sposób opisu wyników w tej części, a przede wszystkim brak odniesienia do wartości IC_{50} w badanej serii pochodnych, pozostawia pewien niedosyt. W dalszym rozwinięciu prowadzonych badań wykazano wysoką selektywność badanych związków (**89**, **108** i **167**) wobec kinazy Mer, w porównaniu z innymi kinazami (Axl i Tyro), a następnie

wykonano badania aktywności metabolicznej z wykorzystaniem komórek MOLM-13 i MV4-11. W celu przeprowadzenia pogłębionych badań właściwości fizykochemicznych i biologicznych, w tym badań toksykologicznych umożliwiających wejście w pierwszą fazę badań klinicznych, powiększono skalę syntezy wyselekcjonowanych związków do ilości gramowych.

Biorąc pod uwagę wdrożeniowy charakter prac, istotny fragment prowadzonych przez mgr Olejkowską badań dotyczył optymalizacji syntezy związku referencyjnego (MRX2843) z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego oraz technologii przepływowej, przy czym dokonano optymalizacji warunków reakcji na każdym z etapów ścieżki syntetycznej. Łącznie przeprowadzono imponującą liczbę ponad 300 eksperymentów, podczas których wykazano przewagę technologii mikrofalowej w porównaniu z metoda klasyczną jak również technologią przepływową. Niezaprzeczalnym sukcesem tej części prowadzonych logicznie prac jest ostateczne skrócenie całkowitego czasu syntezy z ponad 5 dni do niespełna 3 godzin, nie należy również zapominać o aspekcie ekonomicznym, użyto bowiem mniejszych ilości rozpuszczalnika, a na niektórych etapach ograniczono również ilości substratów i katalizatora.

Podsumowując pragnę zaznaczyć, że prace badawcze przedstawione w recenzowanej rozprawie zostały zaplanowane racjonalnie, a poszczególne zadania realizowano z pełną konsekwencją. Doktorantka udowodniła, że potrafi pracować zespołowo, angażując się w interpretację wyników pozyskiwanych na poszczególnych etapach realizacji projektu. Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej rozprawy, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z interdyscyplinarnym charakterem prowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje również to, że napisana ona została poprawnym językiem, choć Doktorantce nie udało się uniknąć drobnych błędów edytorskich/nieprecyzyjnych sformułowań:


- str. 4/str. 55: Doktorantka charakteryzuje ostrą białaczkę limfoblastyczną ALL, używając pojęcia „ekspresja” w odniesieniu do kinazy tyrozynowej MER, podczas gdy ekspresji ulega nie enzym, a gen wskutek nadmiernej aktywności enzymu;
- przedrostki w podstawnikach rozgałęzionych powinny być zapisane kursywą (np. *tert*-butylo), podobnie jak oznaczenia wiązań łączących pierścienie heterocykliczne (np. pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina);
- str. 85–87: podstawniki zestawiono w tabeli 7 w dość chaotyczny sposób, zwłaszcza jeżeli analizuje się je wspólnie z wynikami aktywności inhibicyjnej dla poszczególnych związków zebranych tabelarycznie na stronach 89–100.

Mgr Patrycja Olejkowska ma w swoim dorobku współautorstwo trzech oryginalnych prac naukowych opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR (*European*



Journal of Medicinal Chemistry, Monatshefte fur Chemie – Chemical Monthly oraz *Frontiers in Oncology*). W swoim dorobku posiada również wystąpienia (komunikaty/postery) zaprezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca mgr Patrycji Olejkowskiej spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami*). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bioorganicznej

prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska