



Zachodniopomorski  
Uniwersytet Technologiczny  
w Szczecinie

WYDZIAŁ TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ

dr hab. Jacek Sośnicki, prof. ZUT  
Katedra Chemii Organicznej i Chemii Fizycznej

5.03.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Olejkowskiej opracowana na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (uchwała z dnia 18 stycznia 2024 r.)

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Patrycji Olejkowskiej zatytułowana „**Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL)**” została zrealizowana w ramach doktoratu wdrożeniowego w oparciu o umowę trójstronną pomiędzy Patrycją Olejkowską, firmą Celon Pharma S.A. a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu i współfinansowana jest przez MNiSW. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Jacka Ścianowskiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz promotora pomocniczego dra Abdellaha Yamaniego z firmy Celon Pharma S.A.

Praca dotyczy – ogólnie rzecz biorąc – poszukiwania nowych, małych inhibitorów MerTK o wysokiej aktywności antynowotworowej do zastosowania w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (All), która – jak wiadomo – jest bardzo poważną chorobą, trudną w leczeniu, a dodatkową motywacją w poszukiwaniu środków do jej pokonania może być chociażby fakt, że dotyka ona przede wszystkim dzieci w wieku 2-5 lat. Nie ma więc wątpliwości, że podjęte badania są arcyważne. Głównym celem pracy było zaprojektowanie i zsyntezowanie nowej grupy związków, które selektywnie hamują kinazę MerTK, o korzystnym profilu farmakokinetycznym, niskiej toksyczności, a przede wszystkim o dużej aktywności. Dodatkowym celem było sprawdzenie możliwości wykorzystania techniki mikrofalowej oraz przepływowej do syntezy nowych inhibitorów.

Praca przedstawiona na 263 stronach, zaopatrzona jest wstępem i składa się z następujących, zasadniczych części: z „Części literaturowej” (65 stron), z „Części eksperymentalnej” (77 stron), z „Podsumowania badań własnych”, z „Części doświadczalnej” (101 stron), z rozdziału zatytułowanego „Doktorat wdrożeniowy – wdrożenie do przemysłu” (1 strona) oraz z bibliografii, która zawiera 149 pozycji literaturowych. W mojej ocenie trochę mylące jest zatytułowanie dwóch rozdziałów w bardzo podobny sposób z użyciem synonimów, a mianowicie „Część eksperymentalna” i „Część doświadczalna”, tym bardziej, że ten pierwszy rozdział dotyczy opisu badań własnych Doktorantki, a drugi podaje końcowe procedury i dane spektroskopowe.

W części literaturowej Doktorantka przedstawiła bardzo obszerne informacje na temat białaczki, jej występowania, objawów, diagnozy, uwarunkowań genetycznych, czynników prognostycznych, leczenia, chemioterapii wraz z omówieniem związków stosowanych w różnych fazach terapii. Pod koniec skupiła się na inhibitorach kinaz tyrozynowych, spośród których wiele selektywnych inhibitorów znajduje się w fazie badań klinicznych. Są to głównie związki oparte na szkielecie pirymidynowym oraz pirazolo- i pirolopirymidynowym. W świetle prowadzonych badań w ramach pracy doktorantki ten fragment jest bardzo istotny, gdyż zawiera przegląd struktur najważniejszych inhibitorów tyrozynowych, a wymienione układy heterocykliczne stały się podstawą projektowania i syntezy pochodnych, które otrzymano w ramach przedłożonej pracy. Cały ten fragment części literaturowej napisany jest wybitnie fachowym językiem, w sposób bardzo szczegółowy i merytoryczny. Kolejne dwa rozdziały przedstawione w części literaturowej zawierają ogólne informacje dotyczące technik prowadzenia reakcji metodą przepływową oraz z zastosowaniem reaktora mikrofalowego. Dwa ostatnie dotyczą reakcji sprzęgania Sonogashiry oraz Suzukiego, a więc reakcji, które wykorzystano w syntezie zaplanowanych związków.

Zadaniem Doktorantki było otrzymanie dużej grupy nowych inhibitorów kinazy Mer opartych na szkielecie pirolopirymidynowym oraz opublikowanego związku wzorcowego – inhibitora MRX2843. Dodatkowym zadaniem było sprawdzenie, w jakim stopniu nowoczesne techniki syntezy z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego oraz przepływowego mogą przyspieszyć i ułatwić syntezę zaprojektowanych związków. Realizacja tych zadań została przedstawiona w części doświadczalnej i eksperymentalnej. Jednakże przed przystąpieniem Doktorantki do badań syntetycznych struktury docelowych związków zostały zaprojektowane z wykorzystaniem metod bioinformatycznych. Ostatecznie w wyniku dokowania do białka kinazy MerTK wraz

z uwzględnieniem wielu parametrów (dyskryptorów) kwalifikujących daną strukturę do badań biologicznych, wyselekcjonowano jako cele syntezy 120 cząsteczek, w skład których weszły pochodne pirolopirymidyny oraz pirymidyny. Badania te wraz z wykonaniem końcowych testów komórkowych, sprawdzających aktywność zsyntezowanych związków, zostały wykonane w Laboratorium Analiz Fizykochemicznych oraz w Dziale Badań Przedklinicznych firmy Celon Pharma S.A.

Synteza zaprojektowanych związków było zadaniem ogromnym, co wynika nie tylko z faktu otrzymania 120 docelowych molekuł, które przeznaczono do badań biologicznych, ale także stąd, że każdą z nich otrzymano na wieloetapowej drodze. Związkiem wyjściowym była handlowo dostępna 5-bromo-2,4-dichloropirymidyna, a synteza większości docelowych struktur opierała się na schemacie syntezy inhibitora wzorcowego MRX2843, która obejmowała: aromatyczne aminowanie Buchwalda-Hartwiga, sprzęganie Sonogashiry, odblokowanie funkcji alkinowej z jednoczesnym utworzeniem pierścienia pirolu, wprowadzenie blokady grupy hydroksylowej oraz bromowanie za pomocą NBS-u. Kolejne reakcje, aromatyczne aminowanie Buchwalda-Hartwiga w pozycji C-2 pirymidyny oraz sprzęganie Suzukiego-Miyaura, pozwoliły na modyfikacje otrzymanego wcześniej szkieletu pirolopirymidynowego. Przemiany te zostały przedstawione na schemacie 8. Jednakże po przeanalizowaniu całej pracy muszę stwierdzić, że w przedstawione ścieżki syntezy na schemacie 8 wkraść się błąd niewiadomego pochodzenia, gdyż przedstawiono w nim etap jodowania za pomocą NIS, który prowadzi do jodopochodnych, ale takich syntez nie wykonywano. Co więcej, schemat ten, z prawidłowym zastosowaniem NBS-u, do złudzenia przypomina fragment schematu znajdujący się w publikacji *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7031–7041, która nigdzie w pracy nie została zacytowana. Odnośnik literaturowy tej publikacji powinien znaleźć się w spisie literatury pracy doktorskiej tym bardziej, że dotyczy ona nie tylko syntezy, ale także badań biologicznych inhibitora UNC2025, często wymienianego w części literaturowej pracy.

Struktury otrzymanych związków wraz z wartościami IC<sub>50</sub> i logP zebrano w tabeli. Spośród nich wybrano trzy związki o największym powinowactwie do kinazy Mer i najlepszych właściwościach fizykochemicznych, co gwarantuje ich wysoki potencjał terapeutyczny. Ostateczny wybór związku do I fazy badań przedklinicznych jest w trakcie realizacji.

Wynik ten wskazuje, że zasadniczy cel pracy został osiągnięty i stanowi znaczącą jej wartość. Wytypowanie związków do badań klinicznych znacznie przybliży

szansę uzyskania pożądanego leku, a tym samym wskazuje na praktyczne zastosowania wyników tej pracy, co jest szczególnie istotne w realizacji doktoratu wdrożeniowego.

W kolejnej części pracy opisano próby optymalizacyjne syntezy poszczególnych związków, otrzymywanych w kolejnych etapach, stosując metodę z wykorzystaniem techniki mikrofalowej, a także przepływowej w porównaniu do metody klasycznej, opisanej na początku każdego podrozdziału. Jest to dosyć obszerny fragment pracy opisujący, w jaki sposób zmiana kolejnych parametrów wpływa na przebieg reakcji, a głównym analizowanym parametrem była tu konwersja substratu. Szkoda, że obok konwersji nie zbadano wydajności, z jaką powstaje produkt, chociażby w mieszaninie poreakcyjnej. Jest to dosyć istotne niedopatrzenie, albowiem nie zawsze pełna konwersja prowadzi do lepszej wydajności produktu. Z przeprowadzonej optymalizacji wyciągnięto bardzo wiele wniosków i zapewne informacje te są wartościowe, jednakże – co mnie bardzo dziwi – wyników tych optymalizacji nie wykorzystano w syntezie docelowych związków, gdyż one wszystkie zostały zsyntezowane w sposób klasyczny, co opisano w części eksperymentalnej. Zapewne jest jakieś uzasadnienie takiego postępowania i mam nadzieję, że usłyszę je podczas obrony pracy.

W części eksperymentalnej pracy opisano ogólne procedury syntez poszczególnych związków wraz z ich danymi spektroskopowymi, pogrupowanymi ze względu na typ prowadzonej reakcji. Analizując tę część pracy nasunęły mi się następujące uwagi:

- Uważam, że byłoby dobrze wskazać, które związki są nowe, a które opisane w literaturze. Celowe byłoby ponadto porównanie wydajności, z jakimi zostały otrzymane, a także zweryfikowanie uzyskanych parametrów spektralnych z danymi literaturowymi.

- Pewna część procedur syntez klasycznych opisanych w tej części była już wcześniej opisana w części doświadczalnej, co wydaje się zbędnym zabiegiem, np. na stronach 104 i 161, 112 i 162, 125 i 163, 131 i 164, 136 i 165.

- Dla związku 40 podano trzy opisy syntezy, dwa identyczne na stronach 104 i 161 oraz trzeci na stronie 258, dotyczący nieco większej skali, przy czym związek ten w tym opisie opatrzono numerem 186.

- Zwracam uwagę, że związek 168 został opisany w czasopiśmie *Chemical Communications* w 2017 roku (tom 54, strony 42-45), a jego syntezę

przeprowadzono przy wykorzystaniu promieniowania mikrofalowego. Ten fakt, nie został odnotowany w pracy.

- W ramach jednej opisanej procedury otrzymano związki w postaci soli oraz w postaci wolnej zasady, np. związki 85 i 86 oraz 62 i 63. Czy na pewno nie ma różnic w izolowaniu tych związków?

- W reakcjach bromowania w jednym przypadku otrzymano pochodną z odblokowaną grupą hydroksylową, podczas gdy w pozostałych przypadkach grupa zabezpieczająca nie została naruszona. Zabrakło skomentowania tego faktu.

- Moje wątpliwości budzi sposób zapisu przesunięć chemicznych odczytanych z widm  $^{13}\text{C}$  NMR. W zaproponowanym zapisie pojawiają się symbole sugerujące multipletowość sygnału rezonansowego w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR, analogicznie do widm protonowych. Zaproponowany sposób zapisu jest niewłaściwy i niezgodny z przyjętą konwencją, a świadczy o tym chociażby fakt, że sygnały pochodzące od atomów węgla związanych z atomami fluoru również zostały opisane jako singlety (związki 55, 56, 57, 58, 59, 94, 95, 150, 151, 152, 153, 154), co nie jest możliwe z powodu ich sprzężenia z atomami fluoru, chyba że zastosowano dodatkowe odsprężenie od fluoru. W przyjętej konwencji obok wartości przesunięcia stosuje się w nawiasie litery (s, d, t, q) wskazujące na rzędowość atomu węgla, od którego pochodzi dany sygnał. Stosowane litery są odzwierciedleniem multipletowości widma węglowego, wykonanego bez odsprężenia od protonów lub rzędowości atomów węgla odczytanych z widm  $^{13}\text{C}$ -DEPT NMR. Proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii wraz z pokazaniem podczas obrony kilku przykładowych widm  $^{13}\text{C}$  NMR związków zawierających fluor.

Mimo pewnych uchybień i niedociągnięć ostatecznie całą rozprawę oceniam pozytywnie. Uważam, że pod względem praktycznym jest to wartościowa praca, tym bardziej, że realizowana była w ramach doktoratu wdrożeniowego, a jej główny cel został osiągnięty. Na szczególne podkreślenie zasługuje ogrom pracy eksperymentalnej wykonanej przez Doktorankę ze szczególnym uwzględnieniem syntezy zaprojektowanych związków, co świadczy o jej pracowitości i sprawności w tej dziedzinie. Uważam, że zarówno pozytywne efekty syntez jak i obiecujące wyniki badań biologicznych wnoszą istotny wkład do pokonania ostrej białaczki limfoblastycznej. Moim zdaniem oceniana praca

doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, a także wymogi formalne określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j.: Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Olejkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'P. S. ...', is located on the right side of the page.