

Poznań, 14 lutego 2024

Prof. UAM dr hab. Tomasz Pospieszny
Zakład Produktów Bioaktywnych

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr NATALII PIÓRKOWSKIEJ

pt. „Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
oraz firmie Celon Pharma
pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Ścianowskiego,
promotor pomocniczy dr Abdellah Yamani

Współczesne badania naukowe prowadzone w obszarze takich dziedzin nauki jak chemia, farmacja i medycyna w dużej mierze są skierowane na poszukiwanie nowych aktywnych biologicznie związków chemicznych. Wiele chorób wywoływanych przez wirusy, bakterie czy grzyby w dużym stopniu zostało już opanowanych lub zminimalizowanych, co prowadzi ludzkość do lepszego, wygodniejszego, i zdawać by się mogło, bezpieczniejszego trybu życia. Oczywiście wciąż musimy pamiętać, że rozwój ewolucyjny mikroorganizmów sprawia, że często są one wysoce odporne na opracowane i stosowane środki farmakologiczne. W tym zakresie „walka” ludzkości z czynnikami patogennymi wciąż trwa.

Niestety wraz z rozwojem cywilizacji doszło do zwiększenia zachorowań na choroby układu krążenia oraz nowotwory. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego, w Polsce z przyczyn chorób kardiologicznych umiera rocznie około 175 tysięcy osób oraz jest około 150 tysięcy zachorowań i 90 tysięcy zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. Z tych względów wyjątkowo uzasadniona jest każda praca związana z poszukiwaniem nowych, skuteczniejszych leków stosowanych do minimalizowania lub wyleczenia powyższych chorób.

Autorka dysertacji wybrała kierunek badań polegający na opracowaniu i optymalizacji syntezy inhibitorów kinazy FLT3 odpowiedzialnej za rozwój ostrej białaczki szpikowej

(AML). Ostra białaczka szpikowa należy do agresywnych chorób nowotworowych. Opracowane dotychczas metody terapeutyczne takie jak chemioterapia, radioterapia, transplantacja szpiku kostnego lub komórek macierzystych czy terapie celowane, niestety nie zapewniają pacjentowi całkowitej remisji choroby. Stąd, w moim odczuciu, obrany cel pracy przez Panią mgr Natalię Piórkowską realizowany w ramach projektu „doktorat wdrożeniowy – II edycja”, polegający na opracowaniu nowatorskiego, małowcząsteczkowego inhibitora FLT3 o wysokiej biodostępności po podaniu doustnym i niskiej toksyczności wydaje się w pełni uzasadniony.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest pracą liczącą 294 stron (wydruk jest jednostronny, co niestety nie jest zbyt ekologicznym zabiegiem). Ma ona typowy układ dla tego typu opracowań, na który składają się: Spis treści (3 strony), Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim (po 2 strony), Cel pracy (2 strony), Wykaz stosowanych skrótów (6 stron), Część teoretyczna (64 strony), Badania własne (25 stron), Część doświadczalna (88 stron), Optymalizacja ścieżki syntezy (84 strony), Podsumowanie i wnioski (3 strony), Literatura obejmująca 148 pozycji (10 stron) i Dorobek naukowy Autorki (3 strony). Szkoda, że Autorka nie zestawiała listy tabel (jest ich 108), rysunków (jest ich 22) i schematów (jest ich 32), co niewątpliwie ułatwiłoby ich odszukiwanie w tekście.

Na dorobek naukowy Doktorantki składają się 3 opublikowane prace oryginalne w: *European Journal of Medicinal Chemistry* (2021), *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* (2023), *Frontiers in Oncology* (2024). Warto w tym miejscu odnotować, że w wersji PDF pracy na stronie 292 podane są dwie prace (została pominięta *Frontiers in Oncology*) – natomiast pomyłkowo jest podany poster. Ponadto Pani mgr Piórkowska jest współautorką 7 posterów oraz brała udział w różnych konferencjach i szkoleniach. Niestety nie znalazłem żadnej informacji na czym polegał udział w konferencji. Czy były to wykłady, komunikaty czy postery, które Doktorantka wyszczególniła w osobnym punkcie. Warto odnotować, że Doktorantka otrzymała także 3 granty wydziałowe realizowane w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w czasie od 3 marca do 30 listopada 2020 r., 2 czerwca do 30 listopada 2020 r. oraz 3 marca do 30 listopada 2021 r. Uważam, że wszystkie powyższe wskaźniki świadczą o dobrym poziomie

prezentowanych prac naukowych i stanowią podstawę do postępowania związanego z nadaniem stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Sądzę także, że interesująca z eksperymentalnego punktu widzenia tematyka badawcza mogłaby w przyszłości być dalej realizowana przez Doktorantkę, co wpłynęłoby na zwiększenie Jej dotychczasowych wyników bibliograficznych. Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej oraz analizy dorobku naukowego Pani mgr Natalii Piórkowskiej mogę stwierdzić, że jest ona dobrze rokującym młodym naukowcem.

W części literaturowej Autorka pracy omówiła m. in. charakterystykę ostrej białaczki szpikowej, sposoby jej leczenia, rolę i budowę kinazy FLT3 (w tym miejscu myślę, że Rysunek 2 mógłby być bardziej detaliczny), rolę i znaczenie inhibitorów kinazy FLT3, oporność wielolekową etc. Merytorycznie, ta część pracy, nie budzi moich większych zastrzeżeń.

Cel pracy, stanowiący drugą i zarazem najważniejszą część rozprawy, zakładał opracowanie nowatorskiego, małowcząsteczkowego inhibitora FLT3 o wysokiej biodostępności. W realizacji zamierzonego celu Doktorantka wykorzystwała metody bioinformatyczne *in silico* oraz badania SAR (ang. *Structure-Activity Relationship*). Techniki te są szczególnie użyteczne, ponieważ umożliwiają określenie budowy molekularnej związków oraz pozwalają identyfikować grupę funkcyjną, która może wchodzić w interakcje z komórkami. Ułatwia to wybór związków, które wykazują powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu. Ponadto dla wszystkich otrzymanych związków wykonane zostały badania przedkliniczne, pomagające w określeniu ich aktywności wobec kinazy FLT3, skuteczności działania, biodostępności oraz właściwości farmakokinetycznych. Pani mgr Natalia Piórkowska przeprowadziła analizę właściwości fizykochemicznych związków (rozpuszczalność, liofilowość, stabilność chemiczna i mikrosomalna), a także do ich syntezy wykorzystwała takie technologie jak: chemia przepływowa oraz mikrofalowa. Do określenia struktury związków zastosowana była analiza protonowego oraz węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C NMR, DEPT) oraz spektrometria mas.

Można stwierdzić, że obrany cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany. Pani mgr Natalia Piórkowska opracowała innowacyjny, małowcząsteczkowy inhibitor/ligand kinazy

FLT3 charakteryzujący się wysoką biodostępnością po podaniu doustnym, niską toksycznością, lepszymi bądź zbliżonymi do związków referencyjnych tj. UNC2025 i MRX-2843 parametrami fizykochemicznymi oraz korzystnym profilem farmakokinetycznym. Imponujące jest także stworzenie wirtualnej biblioteki związków liczącej 700 struktur. W pracy Doktorantka otrzymała 110 związków, które w swojej strukturze posiadają pierścień pirymidynowy lub pirolopirymidynowy. Pochodne pirymidyny były otrzymywane poprzez wykorzystanie szeregu reakcji: (1) aromatycznego podstawienia nukleofilowego w położeniu C-4 5-bromo-2,4-dichloropirymidyny, (2) aromatycznego podstawienia nukleofilowego w położeniu C-2 oraz (3) reakcję sprzęgania Suzuki lub Sonogashira w położeniu C-5. Natomiast pochodne pirolopirymidyny Doktorantka otrzymała poprzez aromatyczne aminowanie, krzyżowe sprzęganie Sonogashiry, cyklizację, wprowadzenie grupy zabezpieczającej oraz bromowanie. W kolejnych krokach przeprowadzono aminowanie, reakcje krzyżowego sprzęgania Suzuki lub Sonogashiry oraz odbezpieczenie grupy zabezpieczającej. Poza klasycznymi reakcjami chemii organicznej mgr Piórkowska wykorzystowała także zastosowanie promieniowania mikrofalowego.

Ponadto wykonane zostały testy biochemiczne oraz komórkowe, które pozwoliły Doktorantce wyznaczyć parametr IC_{50} świadczący o aktywności danych związków. Dodatkowo przeprowadzone zostały testy fizykochemiczne, które dostarczyły informacji związanych z rozpuszczalnością, lipofilowością oraz stabilnością chemiczną i mikrosomalną badanych związków. Jak podaje Doktorantka „Jako struktury wiodące wybrałam związki o dużym podobieństwie strukturalnym oraz o zbliżonej wartości IC_{50} względem przynajmniej jednego związku referencyjnego. Dla wybranych związków wykonane zostały badania *in vitro* oraz *in vivo*. Jak również testy określające ich rozpuszczalność, stabilność oraz biodostępność. Trafiły one także na badania MTD w celu określenia dla nich maksymalnej tolerowalnej dawki. W oparciu o dane z wykonanych dotychczas badań przedklinicznych jeden z wybranych związków o numerze **129** wykazuje duży potencjał jako kandydat na lek.” Niewątpliwie jest to znaczny sukces badawczy.

Chciałbym w tym miejscu zadać Doktorantce kilka pytań:

- 1) Jak można wytłumaczyć niskie wydajności niektórych związków np. **41**, **43**, **45** czy **47**?
- 2) Czy próbowała Pani podjąć próby badań molekularnych z wykorzystaniem metod semiempirycznych?
- 3) Czy próbowała Pani wykonać widma EI-MS i zaproponować ścieżki fragmentacji masowej – zwłaszcza pochodnych pirymidynowych?
- 4) Czy któryś ze związków można było badać rentgenostrukturalnie?
- 5) Co uważa Pani za największy sukces swojej pracy?

Jeśli chodzi o formalną stronę przedstawionej do recenzji pracy chciałbym podkreślić jej przejrzystość oraz dobre zilustrowanie wywodzonych tez rysunkami, schematami i tabelami. Zauważyłem kilka drobnych pomyłek literowych, ale uważam, że jest to praktycznie nie do uniknięcia. Z obowiązku Recenzenta muszę wymienić zauważone błędy i niedoskonałości pracy. I tak:

- 1) niedopatrzeniem Autorki jest strona edytorska pracy (np. str. 282 pozycja 1 brak inicjału imienia autora, brak konsekwencji w numeracji związków);
- 2) brak konsekwencji w podawaniu własnych prac w pracy drukowanej i PDF;
- 3) skróty *o-*, *m-* czy *p-* oraz *N*-alkilowanie etc. należy pisać kursywą;
- 4) na Rysunku 3 (str. 38) brakuje krótkiego opisu, co w mojej opinii ułatwiłoby zrozumienie całego szlaku;
- 5) Rysunek 5 (str. 47) jest ewidentnie za mały. Szlak metaboliczny Sorafenibu jest bardzo ciekawy, a niestety z Rysunku 5 nie można go prześledzić;
- 6) Wzory związków **24** (str. 53), **25** (str. 56) oraz **28** (str. 64) są wykonane niestarannie, co obniża graficzną wartość pracy;
- 7) Schemat 3 (str. 104) jest w słabej jakości;
- 8) Schemat 8 (str. 113) jest niewyraźny;
- 9) Rysunek 22 (str. 238) to schemat;
- 10) Sądzę, że mechanizm reakcji sprzęgania Suzuki oraz Sonogashiry – dwóch kluczowych reakcji sprzęgania wykorzystywanych przez Doktorantkę, należało

pokazać w kolorze np. za książką: L. Kürti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, USA/UK 2005, str. 448 i 424;

- 11) Brakuje numeracji atomów węgla w otrzymanych związkach co ułatwiłoby interpretację i przyporządkowanie sygnałów protonów i atomów węgla w podanych widmach magnetycznego rezonansu jądrowego;

Pragnę podkreślić, że wymienione powyżej uwagi w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy.

Reasumując stwierdzam, że dysertacja Pani mgr Natalii Piórkowskiej spełnia wszystkie wymogi określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 roku (w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, Dz.U.2016, poz. 1586). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Natalii Piórkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. UAM dr hab. Tomasz Pospieszny