



**WYDZIAŁ
CHEMII**

Uniwersytet Łódzki
Katedra Chemii Organicznej

Łódź, dnia 14 lutego 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY ZATYTUŁOWANEJ
***„Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowaniu
innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności
przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”***
**Złożonej przez Panią magister Natalię Piórkowską w celu uzyskania stopnia
naukowego doktora nauk chemicznych**

Recenzowana rozprawa doktorska została przygotowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” zgodnie z trójstronną umową pomiędzy Panią magister Natalią Piórkowską, firmą Celon Pharma S.A. a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu. Była ona współfinansowana ze środków MNiSW.

Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Jacek Ścianowski reprezentujący Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Firmę Celon Pharma S.A. reprezentuje Pan dr Abdellah Yamani który pełni rolę promotora pomocniczego.

Zainteresowania naukowe Pana prof. dr hab. Jacka Ścianowskiego obejmują głównie chemię związków seleno-organicznych w tym zagadnienia związane z ich stereochemią oraz aktywnością biologiczną. Można śmiało stwierdzić, iż stworzone przez Niego laboratorium należy do czołowych centrów badawczych chemii selenu w Europie.

Celon Pharma S.A. jest polską firmą farmaceutyczną produkującą odtwórcze produkty lecznicze oraz nowoczesne leki. Firma inwestuje i dba o swoje własne zaplecze badawczo-rozwojowe, zatrudnia wielu pracowników z tytułami doktora biologii molekularnej, farmacji oraz chemii. Warto zaznaczyć, iż publikują oni wyniki swoich badań w recenzowanych czasopismach naukowych. Główne obszary zainteresowań firmy Celon Pharma S.A. to farmaceutyki

przeciwnowotworowe, środki do leczenia chorób neurologicznych oraz cukrzycy. Biorąc pod uwagę powyższe fakty myślę, iż realizacja badań związanych z recenzowaną rozprawą doktorską przebiegała w środowisku akademicko-przemysłowym o ugruntowanej pozycji intelektualnej oraz komercyjno-rynkowej. Jest to ważne stwierdzenie w odniesieniu do „doktoratów wdrożeniowych” które aby odnieść sukces powinny w mojej ocenie być realizowane przy współpracy renomowanych ośrodków akademickich z otwartymi na innowacje i mocnymi rynkowo ośrodkami przemysłowymi. Tutaj ten warunek został spełniony.

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu otrzymanie oraz badania aktywności przeciwnowotworowej nowatorskich inhibitorów kinazy tyrozynowej FTL3 (ang. fms-like tyrosine kinase 3). Zmutowane wersje tego kodowanego na ludzkim chromosomie 13q12 białka odgrywają kluczową rolę w etiologii ostrej białaczki szpikowej.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie 294 stronicowej dysertacji podzielonej na 10 zasadniczych części. Są to: 1) *Streszczenie* w języku polskim, 2) *Streszczenie (Doctoral Dissertation Abstract)* w języku angielskim, 3) *Cel pracy* 4) *Wykaz skrótów*, 5) *Część teoretyczna*, 6) *Badania własne*, 7) *Część doświadczalna*, 8) *Optymalizacja ścieżki syntezy*, 9) *Podsumowanie otrzymanych wyników* oraz 10) *Literatura*. Ich lektura pozwala recenzentowi na zapoznanie się z celami i uzasadnieniem podjętych badań, ich znaczeniem w odniesieniu do danych literaturowych, omówieniem wyników badań własnych wraz z podsumowaniem oraz zestawieniem bibliografii.

W pierwszej części rozprawy (strony 19-32 Części Teoretycznej) doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z biologią układu krwiotwórczego, definiuje ostrą białaczkę szpikową (AML) jako jednostkę chorobową oraz przedstawia stosowane obecnie metody jej leczenia oparte o chemioterapeutyki (głównie antymetabolit Cytarabinę), radioterapię oraz transplantacje szpiku. Na tle tej dyskusji autorka podkreśla konieczność poszukiwania nowych leków przeciw AML. Jest to tym bardziej uzasadnione, iż w chwili obecnej średnia 5-letnia przeżywalność pacjentów z AML wynosi tylko 26%. W następnym dużym

rozdziale swojej pracy przedyskutowana została rola fizjologiczna kinazy FLT3, jej architektura molekularna oraz mechanizm działania. Będące w centrum zainteresowań doktorantki białko FLT3 należy do grupy receptorowych kinaz tyrozynowych – enzymów odpowiadających m.in. za proliferację, różnicowanie, adhezję oraz przemieszczanie się komórek. Odpowiadają one również za prawidłowy rozwój komórek macierzystych oraz składników układu immunologicznego. Białko FLT3 należy do receptorowych kinaz tyrozynowych typu III. Warto podkreślić, iż domeny kinazowe zostały znalezione w 2% wszystkich genów eukariotycznych – co świadczy o ich ewolucyjnie zamierzczłym rodowodzie i wielkim znaczeniu. Podobnie jak geny innych kinaz (np. EGFR TK), również gen kinazy FLT3 ulega licznym mutacjom warunkującym ich dysfunkcyjną aktywność, co leży u podstaw schorzeń nowotworowych takich jak AML. Na kolejnych stronach dysertacji doktorantka opisuje budowę białka FLT3 które podobnie do innych tyrozynowych kinaz receptorowych składa się z zewnątrzkomórkowej domeny receptorowej, domeny transbłonowej, przyściennej oraz domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. Ta wysoce konserwatywna ewolucyjnie domena zbudowana jest z tzw. płatów N i C, spiętych ze sobą konformacyjnie elastyczną (zawiasową) domeną interkinazową. Istotnym elementem strukturalnym wewnątrzkomórkowej domeny o aktywności kinazy tyrozynowej jest tzw. pętla aktywacyjna. Podobnie jak w przypadku innych kinaz tyrozynowych (np. EGFR TK) płat N składa się z pięciu antyrównoległych struktur typu β oraz jednej struktury α -helisy. Płat C FTL3 zawiera siedem α -helis oraz trzy struktury typu β . Konformacyjnie zmienna pętla A (A-loop) przyłączona jest do płata C i uczestniczy w reakcjach przeniesienia grupy fosforanowej. W sytuacji autoufosforylowania reszt Tyr pętla A „otwiera” dostęp do miejsca wiążącego ATP, a w sytuacji przeciwnej rygluje do niego dostęp „wchodząc” między płat N i C. Podobnie jak u innych tyrozynowych kinaz receptorowych również w przypadku FTL3 zakłada się dimeryzację receptora po związaniu z ligandem. Ligandem FLT3 jest występujące w postaci trzech izoform transbłonowe białko FL typu I o masie 20 kD. Białko to, po związaniu z N-

terminalnym fragmentem domeny receptorowej FLT3 i przy udziale dodatkowych czynników biochemicznych stymuluje proliferację komórek progenitowych w szpiku kostnym. Na kończących omawiany rozdział dysertacji stronach autorka dyskutuje rolę receptora FLT3 typu „dzikiego” który występuje u aż 93% przypadków AML, tłumaczy mechanizmy aktywacji receptora kinazy FLT3 oraz omawia mutacje typu wewnętrznej duplikacji tandemowej w domenie przybłonowej oraz punktowe (substytucje) pętli A jako istotne czynniki w etiologii i rozwoju AML.

Zanim przejdę do omawiania następnego rozdziału pracy z obowiązku recenzenta muszę wytknąć bardzo drobny ale rzucający się w oczy błąd edytorski: na stronie 30 w słowie „mają” ostatnia litera została skreślona i wyszło słowo „mają”. Uważam również, iż ilość danych i sformułowań medycznych w omawianej części pracy jest zbyt duża jak dla chemika. Przykładem jest zdanie ze strony 40 cyt: „Pomimo często prawidłowego kariotypu u osób chorych obserwuje się wysoki poziom blastów we krwi co niestety wiąże się z krótkotrwałą odpowiedzią na zastosowane leczenie...”. Nie jest zrozumiałe dla mnie kontekstowo użycie słowa „blastów”.

W następnym fragmencie części teoretycznej swojej dysertacji doktorantka omawia typy i generacje inhibitorów FLT3. Z sześciu typów inhibitorów najwięcej uwagi poświęca typowi I i II czyli inhibitorom które wiążą się z miejscem wiązania ATP gdy białko jest w konformacji DFG-in pętli A (konformacja aktywna) oraz inhibitorom wiążącym się w obszarze hydrofobowym bliskim miejsca wiązania ATP gdy białko jest w konformacji DFG-out (konformacja nieaktywna). W sposób bardzo szczegółowy omawia zalety, wady oraz sprawy związane z kto i kiedy wyprodukował i wprowadził na rynek lub do badań inhibitory I generacji (Sorafenib, Sunitynib, Midostauryna, Lestaurtynib, Tandutynib), II generacji (Giltertynib, Krenolanib, Kwizartynib, KW-2449) i nowszej generacji (Ponatinib). Następnie na dwóch stronach dyskutowany jest problem lekooporności. Autorka podkreśla tu rolę nabytych w trakcie chemioterapii mutacji punktowych w pętli aktywującej FLT3 które osłabiają powinowactwo inhibitorów

do domeny TK oraz czynników bardziej ogólnych jak aktywność cytochromu CYP3A4 czy transporterów ABC które to czynniki zmniejszają stężenie inhibitorów w miejscu ich działania.

W ostatnim zatytułowanym „Zastosowanie technologii reaktorów mikrofalowych i przepływowych (FLOW) w syntezie chemicznej” rozdziale części teoretycznej doktorantka zajmuje się zastosowaniem mikrofal oraz różnych typów reaktorów przepływowych w syntezie organicznej. Omawiając reaktory przepływowe autorka podkreśliła ich zastosowanie w otrzymywaniu artemizyny (lek przeciw malaryczny), tamoksifenu oraz lombustyny (leki przeciwnowotworowe) pominęła jednak zastosowanie mikroreaktorów przepływowych do syntezy radiofarmaceutyków.

Następny rozdział dysertacji to „Badania własne”. Ich punktem wyjściowym były badania z wykorzystaniem programu KNIME mające na celu znalezienie najbardziej optymalnych do syntezy inhibitorów FTL3. W pierwszym etapie doktorantka na drodze numerycznej wygenerowała bibliotekę 700 struktur które następnie wirtualnie „dokowała” do receptora FTL3. Na tym etapie wielce pomocnymi były opublikowane struktury krystalograficzne białka FTL3 związanego z inhibitorami (numery PDB: 6JQR, 4XUF, 5XO2, 6IL3 i 4RT7). Symulacje komputerowe sugerowały doktorantce, iż zasadnym będzie otrzymanie dwóch grup związków heterocyklicznych. Pierwsza to pochodne pirymidyny z podstawnikami w pozycjach 2, 4 i 5 a druga to pochodne 7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny z podstawnikami w pozycjach 2, 5 i 7. Duża liczba z tych podstawników zawierała ugrupowanie acetylenowe – co warto podkreślić. W odniesieniu do diskutowanych tu badań numerycznych mam uwagę. Na stronie 86 paragraf 3.1. autorka wspomina o wartości docking-score - 4 (minus 4) nie wyjaśniając, iż wartość ta odnosi się, jak sądzę, do wartości AutoDock Vina? Mam więc pytanie jaka była wartość Gold Score? W jakich widełkach wartości AutoDock Vina autorka uznawała badaną cząsteczkę za atrakcyjną do otrzymania w laboratorium? Szkoda, iż w dysertacji nie znalazł się choć jeden rysunek przedstawiający cząsteczkę, np. **129**, w miejscu aktywnym FLT3.

W następnej fazie prac, doktorantka otrzymała 110 nowych związków heterocyklicznych. Opisy ich syntez znajdują się trochę nie chronologicznie bo dopiero na stronach od 107 do 194 (rozdział „Część doświadczalna”). W celu otrzymania nowych połączeń doktorantka stosowała głównie metody klasycznej syntezy organicznej a w niektórych przypadkach wzbogacała je zastosowaniem reaktorów przepływowych i technologii mikrofalowej. Postęp reakcji kontrolowała korzystając ze spektrometrii mas. Budowę oraz czystość otrzymanych produktów określała za pomocą spektroskopii NMR, spektrometrii mas oraz HPLC. Wszystkie produkty posiadały czystość powyżej 95% (HPLC). Syntezę referencyjnego związku UNC2025 przeprowadziła w oparciu o procedurę opracowaną przez Uniwersytet Karoliny Północnej. Rozumiem, iż była ona udostępniona firmie Celon S.A. lub opublikowana w recenzowanym czasopiśmie? Omawiany fragment pracy nie pozostaje bez pewnych błędów o których z obowiązku recenzenta wypada mi zakomunikować. Pierwszym rzucającym się w oczy jest lapsus językowy „Krzyżowe sprzężanie Suzukiego” na stronie 113. Inne błędy edytorskie to Pd(O) zamiast Pd(0), na Schemacie 7 (str. 112) geometria produktu jest błędna. Schemat 8 jest niezbyt estetycznie narysowany. Sformułowanie „transmetalacji” winno być zmienione na „transmetalowania” (str. 110). Wydajności reakcji są zapisane w konwencji anglo-saskiej czyli z kropką zamiast z przecinkiem. Niektóre wydajności reakcji podane są z dokładnością do jednego miejsca po kropce a inne nie. W opisach widm ^1H NMR brak przypisanych sygnałów do konkretnych protonów. Jednak, co należy podkreślić, procedury syntetyczne są napisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie a całkowity nakład pracy który doktorantka włożyła w otrzymanie wszystkich nowych związków znaczący. Kolejnym zadaniem eksperymentalnym, które opisuje autorka, to optymalizacja procesu otrzymywania inhibitora UNC2025. Jego konwencjonalna synteza obejmowała 8 etapów przedstawionych na schemacie 4, strona 109 dysertacji. Niestety, na schemacie 4 ani w tekście rozdziału w którym on się znajduje, nie znalazłem informacji o sumarycznej wydajności tej syntezy. Optymalizacja syntezy inhibitora UNC2025 opisana w rozdziale 5

(„Optymalizacja ścieżki syntezy”) zabiera czytelnika w pasjonującą podróż opisującą sukcesy i porażki wieloetapowych procesów syntetycznych FLOW oraz „konwencjonalnych” syntez mających na celu otrzymanie docelowej molekuly inhibitora. Początkowo doktorantka opisuje krok po kroku kolejne etapy otrzymywania UNC2025 przedstawione na schemacie 11 strony 195 i 196. Autorce udaje się rozwiązywać wszystkie pojawiające się problemy aż do etapu 5 czyli reakcji halogenowania za pomocą NBS. Tutaj mimo wielu wysiłków sukces jest bardzo ograniczony bowiem udaje się otrzymać oczekiwaną bromo pochodną jedynie w przypadku substratu z zabezpieczonymi grupami aminową i hydroksylową. Ponieważ doktorantka nie wymienia w tekście wydajności z jaką otrzymała ten produkt zakładam, iż była to ilość znikoma. Wobec tego niepowodzenia doktorantka przeprojektowała swoją strategię syntetyczną. Została ona zaprezentowana na schemacie 23 strona 242 i składała się z 6 etapów (reakcji Sonogashiry, cyklizacji, zabezpieczenia grupy hydroksylowej, bromowania, substytucji atomu chloru, i reakcji Suzuki). W przeciwieństwie do strategii zaprezentowanej wcześniej (schemat 11) nowa strategia przyniosła lepsze rezultaty. Doktorantka z powodzeniem stosowała techniki przepływowe z zastosowaniem komercyjnych systemów Easy MedChem oraz R-series, tradycyjne metody syntezy oparte o reakcje w kolbach okrągłodennych i techniki mikrofalowe. Dla większości reakcji udało się tak dobrać warunki aby zapewnić 100% wydajność procesu. Największe problemy napotkała autorka przy optymalizacji reakcji Suzuki w warunkach reakcji w reaktorze przepływowym. Tutaj jednak z pomocą przyszła technologia mikrofalowa przy pomocy której udało się uzyskać 100% konwersji substratów w produkt w czasie 30 minut przy zastosowaniu radiogeneratora o mocy 150 W. W tym miejscu muszę zadać pytanie techniczne czy wymieniona temperatura tej reakcji (90 °C) wynikała z pracy mikrofalii czy tradycyjnego ogrzewania dodatkowo „stymulowanego” napromieniowywaniem? Intuicyjnie myślę, iż to 150 W generowało temperaturę reakcji, ale z lektury tekstu bardzo jasno to dla mnie nie wynika. Kolejna uwaga dotyczy faktu, iż aktywny inhibitor UNC2025 posiada odbezpieczoną grupę

hydroksylową (Schemat 4 str. 109). Dlaczego autorka w swojej strategii syntezy poprzestała na cząsteczce która posiada zabezpieczoną grupę hydroksylową czyli formalnie inhibitorem UNC2025 jeszcze nie jest?

Kończąc omawianie zagadnień czysto chemicznych czas powrócić do kwestii aktywności biologicznej otrzymanych wielkim nakładem pracy nowych 110 związków. Badania aktywności biologicznej zostały opisane w rozdziale 3.2. „Aktywność biologiczna nowo opracowanych cząsteczek, ich właściwości fizykochemiczne oraz analiza ADMET” na stronach 88-104 rozprawy. Zostały one wykonane przez Dział Biologii firmy Celon Pharma S.A. i obejmowały testy aktywności inhibitorowej kinazy FLT3, oceny stabilności związków w mikrokosmkach mysich i ludzkich, badania parametrów fizykochemicznych logP oraz logD i oceny przenikania związków przez błony biologiczne. Wyselekcjonowane na podstawie powyższych testów cząsteczki były następnie badane pod kątem ich aktywności antyproliferacyjnej względem ludzkich komórek ostrej białaczki linii KASUMI-1, NOMO-1 i MOLM-13. Wykonano również badania *in vivo* na myszach w celu określenia biodostępności, maksymalnego stężenia, i czasu po którym stężenie związku w osoczu osiąga wartość maksymalną. Zdecydowana większość z badanych połączeń wykazała niską nanomolarną aktywność inhibitorową wobec FTL3. Jest to wynik bardzo dobry i zasługujący na podkreślenie. Do dalszych badań doktorantka wybrała pirolopirymidynowe pochodne **69** i **129** o $IC_{50}^{inhibFTL3}$ równym odpowiednio 2.3 i 0.9 nM. Podobnie do związków referencyjnych, związek **129** nie ulegał degradacji chemicznej w warunkach pH 7,4 po 24 godzinach inkubacji oraz charakteryzował się podobną do związków referencyjnych stabilnością metaboliczną u myszy. W aspekcie opisu wyników badań aktywności biologicznej najwięcej pytań rodzi tabela 20 (strona 106). Domyślam się, że przedstawia ona wartości IC_{50} obrazujące aktywność antyproliferacyjną względem komórek nowotworowych? Trzeba zadać w tym miejscu kilka pytań. Mianowicie po jakim czasie inkubacji (24, 48 czy 72 godzin) oznaczano wartości IC_{50} i jaką metodą? W jakich jednostkach wyrażone są wartości IC_{50} ? Jakie są błędy pomiaru? Jakie wartości IC_{50} zostały oznaczone dla

związku 129? Jakie są wartości IC_{50} badanych związków wobec komórek nienowotworowych? Autorka podkreśliła, że obydwa te związki są w chwili obecnej na etapie badań przedklinicznych. Zakładam więc, iż dane te są dostępne i powinny być przedstawione bo stanowią istotną część rozprawy.

Następny rozdział rozprawy to „Podsumowanie otrzymanych wyników” w którym na niecałych trzech stronach omówione są najważniejsze osiągnięcia pracy. Nie mam do niego uwag z wyjątkiem faktu, że autorka stosuje anglojęzyczny skrót h na oznaczenie godziny i kropkę zamiast przecinka. Kolejny fragment pracy doktorskiej to „literatura”. Doktorantka cytuje 148 pozycji z czego 22 to odnośniki do źródeł internetowych. Nie mam uwag co do tego fragmentu pracy.

Rozprawa doktorska napisana jest starannie i do ostatniego momentu była korygowana. Plik pdf zatytułowany „Praca finalna Piórkowska” z dnia 22.01.2024 zawierał błędy edytorskie których w wersji wydrukowanej pracy już nie było. Na stronie 38 dysertacji z pdf-u tytuł podrozdziału 2.2.5. brzmi: „Mechanizm aktywacji receptora kinazy FLT3” natomiast w spisie treści przyjmuje skróconą postać: „Mechanizm aktywacji”. Dodatkowo w pdf-ie wymieniona jest publikacja w *Eurobask* (którego nie znam) natomiast w wersji wydrukowanej jest ona przesunięta do wystąpień posterowych. W wersji papierowej dodano najnowszą publikację z *Frontiers in Oncology* co rozumiem bo ukazała się ona w 2024 roku. Podkreślam, iż powyższe uwagi nie obniżają wysokiej merytorycznej oceny dysertacji. Wprowadzone poprawki zwiększają jej wartość.

Po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pani magister Natalii Piórkowskiej jestem przekonany, że jest ona doświadczonym i wnikliwym eksperymentatorem, zdolnym do samodzielnego prowadzenia badań naukowych w dyscyplinie naukowej nauk chemicznych. Dodatkowo, stwierdzam, iż doskonale odnajduje się ona w realizacji programów badawczych o profilu komercyjnym które wymagają innego podejścia niż badania czysto akademickie. Przedstawiony w rozprawie doktorskiej dorobek publikacyjny Pani magister Natalii Piórkowskiej obejmuje publikacje na łamach czasopism z listy Filadelfijskiej jakim są w *European*

Journal of Medicinal Chemistry (IF = 6,7), *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* (IF = 1,8) oraz *Frontiers in Oncology* (IF = 4,7). Publikacje te choć zdecydowanie nawiązują do tematyki rozprawy doktorskiej to nie są z nią w sposób bezpośrednio związane. Pani magister Natalia Piórkowska jest też współautorką siedmiu posterowych doniesień konferencyjnych które prezentowała w Toruniu, Lublinie, Berlinie i Dublinie. Dodatkowo uczestniczyła w ośmiu innych warsztatach, szkoleniach i zjazdach naukowych. Doktorantka była beneficjentką grantów wydziałowych. Były one realizowane w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i dotyczyły zastosowania technologii reaktorów przepływowych oraz mikrofal w otrzymywaniu inhibitorów o aktywności przeciw ostrej białaczce szpikowej.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani magister Natalii Piórkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.


prof. dr hab. Konrad Kowalski