



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

Instytut Chemii Organicznej PAN
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa
Polska

Dr hab. inż. Dominik Koszelewski

+48 22 343 20 12
dominik.koszelewski@icho.edu.pl

Warszawa, 30 czerwca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Stanisława Michałka zatytułowanej „*Flow chemistry w syntezie inhibitorów kinaz. Optymalizacja procesu i powiększenie skali*”

wykonanej w Katedrze Technologii Chemicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, pod opieką merytoryczną Pana dr hab. inż. Zbigniewa Ochala (prof. Uczelni PW) oraz Pana dr inż. Marcina Zagozdy (Celon Pharma). Recenzowana rozprawa doktorska ma charakter wdrożeniowy i została wykonana we współpracy z firmą farmaceutyczną „Celon Pharma S.A.”

Uwagi wstępne

Pan Stanisław Michałek uzyskał w 2013 roku tytuł zawodowy magistra na kierunku Technologia Chemiczna, na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, specjalność: Synteza, kataliza i procesy wysokotemperaturowe.

Recenzja została przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z dnia 23 maja 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów, w tym mojej osoby, w przewodzie doktorskim Pana mgr. inż. Stanisława Michałka. Decyzja Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne została zawarta w piśmie z dnia 25 maja 2023 r., doręczonym wraz z rozprawą doktorską dnia 29 maja 2023 r.

Tematyka i struktura pracy

Dysertacja pana mgr. Stanisława Michałka to inspirująca i dobrze przemyślana praca z pogranicza chemii medycznej i technologii chemicznej. Dotyczy ona zastosowania procesów przepływowych w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej, prekursorów inhibitora lipidowej kinazy PI3K δ . Kinazy lipidowe pośredniczą w regulacji większości dróg przenoszenia sygnału zewnątrzkomórkowego oraz kontrolują takie procesy jak wzrost, różnicowanie komórek, cykl komórkowy, sygnalizacja wewnątrzkomórkowa. Ze względu na ich kluczową rolę w procesie przenoszenia sygnałów, odpowiednia regulacja ich aktywności jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. W wyniku mutacji genów kodujących kinazy, może dojść do nadmiernej aktywacji tych enzymów, a to prowadzi do niekontrolowanego wzrostu i namnażania się komórek, zwiększenia angiogenezy (tworzenia naczyń krwionośnych w obrębie guza) oraz wystąpienia przerzutów nowotworu. Leki będące inhibitorami kinaz mają za zadanie blokować aktywność tych enzymów. Inhibitory kinazy mogą również blokować wzrost nowych naczyń krwionośnych, których nowotwory potrzebują do wzrostu. Rola kinazy PI3K δ została potwierdzona w inicjacji i utrzymaniu stanu zapalnego m.in. w astmie, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, a także reumatoidalnym zapaleniu stawów i innych chorobach autoimmunologicznych.

Przedstawiona do recenzji praca Pana mgr inż. Stanisława Michałka wpisuje się w ten aktualny i nowoczesny nurt badawczy. Dotyczy ona opracowania metody syntezy kluczowych bloków budulcowych heterocyklicznego związku o roboczej nazwie CPL302415, będącego



inhibitorem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. Modyfikacja aktywności tej kinazy, zgodnie z wynikami uzyskanymi przez zespół naukowców firmy Celon Pharma S.A., może być wykorzystana w leczeniu układowego toczenia rumieniowatego. W rozprawie poruszono również aspekt syntezy chemicznej aktywnych składników farmaceutycznych API (eng. Active Pharmaceutical Ingredients) z wykorzystaniem reaktorów przepływowych. Ze względu na duże ilości inhibitora, konieczne do przeprowadzenia niezbędnych badań związanych z opracowaniem nowego leku, istniała potrzeba opracowania efektywnej drogi syntezy wspomnianego inhibitora CPL302415. Doktorant proponuje zastosować w swojej pracy zautomatyzowany system przepływowy. To popularne podejście do efektywnej syntezy związków organicznych. Badania opisane w publikacjach wymagały przeprowadzenia wielu eksperymentów, optymalizacji warunków reakcji i odpowiedniego doboru katalizatora. Są to zatem badania żmudne i pracochłonne.

Naukowa ranga w dziedzinie związków biologicznie czynnych Zespołu kierowanego przez promotora niniejszej rozprawy, Pana dr hab. inż. Zbigniewa Ochala (prof. PW) upoważnia mnie do stwierdzenia, że mgr inż. Stanisław Michałek miał odpowiednie wsparcie merytoryczne. Ze względu na wdrożeniowy charakter doktoratu, część prac wykonanych została pod opieką Pana dr inż. Marcina Zagodę w nowoczesnym laboratorium firmy „Celon Pharma S.A.”, dysponującym rozwiązaniami technicznymi, koniecznymi do przeprowadzenia badań związanych z tematem pracy.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana Stanisława Michałka stanowi cykl dwóch prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy JCR wraz z 38 stronicowym omówieniem. Praca została napisana w języku polskim. Niezrozumiały jest dla mnie powód, dla którego tytuł rozprawy zawiera angielskie sformułowanie „*flow chemistry*”. Chemiczna nomenklatura polska zawiera stosowane określenia np.: „w reaktorach przepływowych”. Publikacje składające się na cykl prac zostały zamieszczone w czasopismach z listy JCR o dostępie otwartym *RSC Advances* (Royal Society of Chemistry, Q2) oraz dostępie ograniczonym *Reaction Chemistry & Engineering* (Royal Society of Chemistry, Q2/Q2). Omówienie składa się ze streszczenia po polsku i angielsku, spisu treści i zastosowanych skrótów, osiągnięć Doktoranta, wstępu literaturowego opisującego technologię prowadzenia reakcji w reaktorach przepływowych oraz metody projektowania eksperymentów chemicznych. Uważam tę część rozprawy za przygotowaną dobrze i napisaną ciekawie, chociaż Autor nie ustrzegł się różnych drobnych błędów stylistycznych, wynikających prawdopodobnie z pewnego pośpiechu. Niektóre z nich pozwolę sobie wymienić. Kilukrotnie powtarzające się stwierdzenie dotyczące „otrzymywania wydajności” powinno być „otrzymywanie produktu z wydajnością”. Na stronie 18-stej brakuje orzeczenia „*rodzaj reaktora prowadzenie*”, strona 19: eksperymenty i doświadczenia są policzalne, dlatego też poprawnym jest stosowanie liczby a nie ilości w odniesieniu do tych rzeczowników. Następnie przechodzimy do celu pracy oraz omówienia dwóch publikacji wraz z podsumowaniem badań własnych. Spis literatury wieńczący opis obejmuje 89 pozycji. Kolejną część pracy stanowią oświadczenia opisujące wkład własny Autorów. Pracę zamykają kopie dwóch publikacji wraz z materiałami dodatkowymi. Całość rozprawy liczy 99 stron.

Na podstawie załączonych oświadczeń Doktoranta, jak i współautorów można twierdzić, że Doktorant wykonał większość prac eksperymentalnych, które osobiście zaplanował i brał udział w opracowaniu ich koncepcji oraz zarysowaniu celów badawczych. Otrzymane wyniki zinterpretował i samodzielnie opracował. Współuczestniczył w pisaniu i redagowaniu manuskryptów, opracowaniu informacji dodatkowych oraz odpowiedzi dla recenzentów. Należy



również zaznaczyć, że Pan mgr Stanisław Michałek jest pierwszym autorem wszystkich prac, a w jednej z nich jest autorem korespondencyjnym.

Ocena merytoryczna rozprawy

Dysertacje, których podstawę stanowią publikacje są trudne do recenzowania, gdyż zawartość merytoryczna każdej z nich została już dokładnie oceniona przez co najmniej dwóch recenzentów powołanych przez redakcje odpowiednich czasopism. Mogę natomiast stwierdzić, że cykl załączonych publikacji stanowi realizację bardzo dobrego pomysłu, czego dowodem są uzyskane przez Doktoranta wyniki. Merytoryczna część pracy rozpoczyna się od jednostronicowego rozdziału poświęconego celom rozprawy. Doktorant podkreśla, że głównym celem badań było sprawdzenie możliwości przełożenia poszczególnych etapów syntezy heterocyklicznych inhibitorów kinaz, z reakcji prowadzonych w reaktorze okresowym, na proces w reaktorze przepływowym, celem powiększenia skali. Uprzednio inhibitor CPL302415 został otrzymany w klasycznych warunkach, w czteroetapowej reakcji z komercyjnie dostępnej pochodnej pirazolo[1,5-a]pirymidyny. Procedura ta została szczegółowo opisana, przy współudziale pana mgr. Michałka, w czasopiśmie *Pharmaceuticals* (MDPI). Przeprowadzone badania optymalizacyjne z zastosowaniem reaktora okresowego, umożliwiły zwiększenie wydajności produktu reakcji *N*-alkilowaniu, będącego pierwszym etapem syntezy inhibitora CPL302415. Pomimo licznych prób optymalizacji prowadzenia tego etapu, syntezy w reaktorze przepływowym i wynikających trudności związanych z zapychaniem się układu przepływowego, dalsze prace zawieszono. Dlatego też Doktorant skupił się na pozostałych etapach syntezy, celem realizacji ich w układach przepływowych. Chciałbym zauważyć, iż w opisie pod rysunkiem 8 Doktorant użył angielskiego słowa „*reflux*” a powinno być „w temperaturze wrzenia”, gdyż słowo *reflux* dotyczy dziedziny nauk medycznych i odnosi się do schorzenia układu żołądkowo-przełykowego. Moja generalna uwaga dotyczy przygotowania przez Doktoranta rycin, na których znajdujemy nieprzetłumaczone zwroty angielskie (patrz: cały Rys. 9, Rys. 11 „*this work*”, cały Rys. 12). Ponadto uważam, że powinno się stosować określenie „schemat” do rycin przedstawiających konkretne transformacje chemiczne. Doktorant stosuje również różne formatowanie poszczególnych rycin co obniża ocenę szaty graficznej przygotowanej rozprawy (np.: różnej wielkości struktury związków, nieregularnie wyróżnione kolorami grupy funkcyjne).

Kolejna część poświęcona została omówieniu wyników zamieszczonych w pracach A1 i A2. Dotyczą one przygotowania poszczególnych prekursorów do syntezy inhibitora kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. Prawdopodobnie, ze względu na pośpiech Doktoranta w przygotowywaniu streszczenia, wkraść się błąd tłumaczenia na język polski tytułu artykułu A1 (Strona 23, „*Projektowanie eksperymentu (DoE) z wykorzystaniem flow w katalizowanym palladem...*”). Komentowana praca dotyczy reakcji selektywnego utleniania alkoholu do aldehydu celem dalszej funkcjonalizacji kluczowego prekursora inhibitora CPL302415. Główny problem jaki napotkał Doktorant w realizacji tego zadania, to bardzo niska rozpuszczalność alkoholu oraz konieczność stosowania olbrzymiego nadmiaru utleniacza w postaci dwutlenku manganu. Generowało to dużą ilość odpadów. Dochodziło również do niepożądanego adsorbpcji produktu na powierzchni MnO_2 utrudniając tym samym jego wydzielenie. Aby wyeliminować tę niedogodność, Doktorant sprawdził szereg alternatywnych katalizatorów reakcji utleniania, z czego najlepszym okazał się układ octan palladu (II)/pirydyna/ O_2 . Na tym etapie projektowania eksperymentów konieczne było również dobranie stosownego układu przepływowego. Zastosowanie czterech reaktorów przepływowych,



właściwych pomp oraz zaworów, zapewniło skuteczne mieszanie substratów oraz odpowiedni poziom natlenienia mieszaniny reakcyjnej. Należy zauważyć, iż ta część badań bardzo dobrze koresponduje ze wstępem literaturowym, w którym poruszane są zarówno kwestie techniczne, związane z technologią prowadzenia reakcji w reaktorach przepływowych, jak również efektywnym projektowaniem eksperymentów, w celu zminimalizowania liczby niezbędnych eksperymentów optymalizacyjnych. Dążąc do usprawniania oczyszczania produktu reakcji utleniania, prowadzonego początkowo w kaprolaktamie, Doktorant sprawdził różne układy rozpuszczalników, typując toluen:octan etylu 1:1 jako optymalny dla całego procesu. Należy podkreślić, że opracowany protokół, poprzez wyeliminowanie znacznej części odpadów, dobrze wpisuje się w założenia zielonej chemii. Proszę o wyjaśnienie kwestii zanieczyszczeń metalami oraz teratogennymi zasadami, z którymi możemy mieć do czynienia w przypadku tego układu katalitycznego. Czy określono poziom tych zanieczyszczeń w produkcie? Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na Rysunek 10-ty przedstawiający możliwe produkty utlenienia substratu **2**. Doktorant w swoim streszczeniu oraz danych zebranych w Tabeli 1 omawia dwa z nich; aldehyd **3** oraz alkohol **5** z odtworzonym układem benzimidazolu. Nie ma natomiast żadnego komentarza odnośnie produktu **6** będącego efektem nioselektywnego utleniania do kwasu. Wymagałbym również pewnej konsekwencji w numerowaniu związków umieszczonych na rycinach występujących po sobie, gdyż na Rys. 10 brakuje związku **4**. Proszę również o komentarz do wyników umieszczonych w Tabeli 1, pozycja 5 i 6. Widzimy, że zastosowano te same parametry procesowe. Z czego więc wynikają różnice w składzie mieszaniny poreakcyjnej określanej na podstawie UHPLC?

W kolejnej części rozprawy Doktorant przechodzi do streszczenia drugiego manuskryptu A2, dotyczącego selektywnej reakcji redukcji estru **1** do odpowiedniego aldehydu **3**, będącego kluczowym blokiem budulcowym inhibitora CPL302415. Synteza estru **1** została szczegółowo opisana w manuskrypcie, którego współautorem jest również mgr Michałek. Jednakże praca ta nie wchodzi w skład cyklu prac recenzowanej rozprawy doktorskiej. Jest oczywistym, że publikacje prezentujące badania eksperymentalne są wynikiem pracy zespołowej, a poszczególni członkowie zespołu wnoszą większy lub mniejszy wkład w ich powstanie. Z oczywistych względów Doktorant opisuje tylko te eksperymenty, które sam przeprowadził. Chciałbym zauważyć, że po dogłębnym zapoznaniu się z omawianym manuskrytem A2, który kompleksowo opisuje problem redukcji estru **1**, eksperymenty wykonane przez mgr Michała odegrały kluczową rolę w skutecznej realizacji postawionego sobie celu. Początkowo współautorzy owego manuskryptu postanowili użyć do redukcji w układzie przepływowym kompleksów rutenu, jednakże nie uzyskano satysfakcjonujących wyników. Jako alternatywę Doktorant zaproponował wodorek diizobutyloglinu (DIBAL-H), popularny odczynnik redukujący estry do aldehydów. Zastosowanie tego odczynnika nawet w bardzo niskiej temperaturze (-60°C) w układzie przepływowym prowadziło wyłącznie do uzyskania mieszaniny alkoholi **2** i **5**. W związku z niepowodzeniem przeprowadzenia selektywnej redukcji estru do aldehydu, Doktorant postanowił wrócić do poprzedniego podejścia, włączając do ścieżki syntetycznej etap redukcji, a następnie selektywnego utleniania opisanego w pracy A1. Aby wyeliminować problem związany z koniecznością utrzymywania bardzo niskiej temperatury strumienia substratów dla układu przepływowego w przypadku DIBAL-u, Doktorant zdecydował się użyć glinowodorek litu. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że temperatura ma istotny wpływ na chemoselektywność reakcji redukcji prowadząc do mieszaniny dwóch alkoholi z wydajnością sumaryczną 84%. Dominującym produktem był alkohol **5**



z niezredukowanym wiązaniem podwójnym w pierścieniu benzimidazolu. Selektywność redukcji względem produktu **5** wyniosła 91%. Ze względu na lepszą rozpuszczalność w porównaniu z alkoholem **2**, związek **5** stanowi dogodniejszy półprodukt do syntezy inhibitora CPL302415 w warunkach przepływowych, co znacząco obniża sumaryczny koszt produkcji. Do moich drobnych uwag dotyczących tej części streszczenia zaliczyłbym nietypowy sposób przedstawienia czasu prowadzenia reakcji (Tabela 2) gdyż wartości te podano jako ułamki dziesiętne minuty, a powinny być w sekundach.

W ostatniej części streszczenia swoich wyników Doktorant opisuje kluczowy etap syntezy inhibitora pan-FGFR, kryjącego się pod nazwą CPL304110. Etap ten związany jest z reakcją kondensacji Claisena nienasyconego ketonu ze szczawianem dietylu. Początkowo Doktorant skupił się na opracowaniu warunków dla reakcji prowadzonej w reaktorze okresowym. Odpowiedni dobór rozpuszczalnika zapewniającego dobrą rozpuszczalność jednego z substratów umożliwiło uzyskanie pożądanego produktu kondensacji z wysoką wydajnością. Optymalizacja parametrów w reaktorze przepływowym z wykorzystaniem centralnego planu kompozycyjnego (CCD) oraz powierzchni odpowiedzi (RSM) umożliwiła Doktorantowi dobranie takich parametrów procesu, jakie przełożyły się na otrzymanie produktu z porównywalną wydajnością do tej, uzyskanej w reaktorze okresowym. Produktywność tego procesu wyniosła 74,4 g/h, a wydajność czasoprzestrzenna 3720 g/h/m³. Zgodnie z oświadczeniem Doktoranta, uzyskane na tym etapie badań wyniki zostały zebrane w postaci manuskryptu i przesłane do wydawnictwa. Doktorant nie umieścił żadnych dodatkowych informacji odnośnie nazwy czasopisma, w którym praca jest obecnie ewaluowana. Ze względu na brak szczegółowych danych analitycznych typu widma NMR, analizy masowej uzyskanego produktu, muszę wierzyć na słowo, że Doktorant zrealizował swój cel. Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym również zwrócić uwagę, że w omawianej części streszczenia brakuje Rysunku 13.

Reasumując stwierdzam, że przyszło mi recenzować interesującą pracę doktorską. Wyniki przedstawione w rozprawie niewątpliwie posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w dwóch pracach w czasopismach o wysokim standardzie międzynarodowym. Wszystkie opisane w rozprawie pomysły dotyczące użycia układów przepływowych w syntezie inhibitora kinazy PI3Kδ (CPL302415) oraz inhibitora pan-FGFR (CPL304110) zostały pozytywnie zweryfikowane. Warto wspomnieć, że mgr inż. Michałek jest autorem korespondencyjnym jednego z manuskryptów wchodzącego do cyklu prac omawianej dysertacji. Doktorant jest też współautorem trzech prac, z których dwie mają związek z tematyką przedstawionej rozprawy. Ponadto, wyniki jego badań prezentowane były na dwóch konferencjach naukowych.

Przedstawione w recenzji uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Uzyskane wyniki oraz sposób ich interpretacji i prezentacji dowodzą ogólnej wiedzy Autora w dziedzinie chemii organicznej. Mgr inż. Stanisław Michałek wykazał się ponadto samodzielnością prowadzenia badań na szerokim froncie naukowym. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca, spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauk chemicznych. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr. inż. Stanisława Michałka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dominik Koszelewska