

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Stanisława Michałka pod tytułem

„Flow chemistry w syntezie inhibitorów kinaz. Optymalizacja procesu i powiększanie skali”

przygotowanej pod kierownictwem

dr hab. inż. Zbigniewa Ochala profesora Politechniki Warszawskiej

oraz promotora pomocniczego dr inż. Marcina Zagozdy z firmy Celon Pharma S.A.

1. Formalna charakterystyka pracy

Podstawę przesłanej do recenzji pracy doktorskiej stanowią dwie oryginalne, wieloautorskie publikacje, z których pierwsza (A1) ukazała się w 2022 roku w czasopiśmie RSC Advances (IF₂₀₂₂ = 4,036), a druga (A2) w 2023 roku w Reaction Chemistry and Engineering (IF₂₀₂₂ = 5,200). W obu pracach Doktorant jest pierwszym, a w pracy z 2023 roku również autorem korespondencyjnym (wspólnie z dr hab. Anną Maj).

Cele badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej obejmowały optymalizację parametrów reakcji z wykorzystaniem reaktora przepływowego i zwiększenie skali wybranych etapów syntezy dwóch związków rozwijanych przez Celon Pharma S.A. Pierwszym z nich był związek CPL302415 wykazujący aktywność inhibitora kinazy 3-fosfoinozytoli, który jest kandydatem na lek w terapii toczenia rumieniowatego, a drugim związek CPL304110 będący inhibitorem receptora dla czynnika wzrostu fibroblastów.

Całość opracowania, oprócz wymienionych wyżej publikacji, zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji i prezentacji konferencyjnych wchodzących w skład dorobku naukowego Doktoranta, wstęp teoretyczny, przedstawienie celów badań, jak też omówienie wcześniej otrzymanych wyników, które dotyczyły prób zastąpienia reaktora okresowego przepływowym na pierwszym etapie syntezy związku CPL302415. Kolejne rozdziały to opis prac eksperymentalnych przeprowadzonych bezpośrednio przez Autora na drodze optymalizacji kolejnych etapów syntezy CPL302415, których rezultaty opublikowano we wspomnianych artykułach. Kolejny krótki rozdział zawiera opis najnowszych badań dotyczących optymalizacji reakcji kondensacji Claisena na ścieżce syntezy związku CPL304110. Otrzymane wyniki weszły w skład manuskryptu znajdującego się w trakcie procesu redakcyjnego. Część opisową pracy doktorskiej kończy Podsumowanie oraz licząca 89 pozycji bibliografia.

Zgodnie z wymogami dotyczącymi określenia udziału własnego w publikacjach wieloautorskich, do pracy doktorskiej zostały dołączone stosowne oświadczenia Doktoranta i współautorów.

We wstępie teoretycznym Doktorant w zwarty sposób przedstawił zagadnienia związane z podjętą tematyką, a więc: technologię prowadzenia reakcji w reaktorach przepływowych, charakterystykę elementów składowych wykorzystywanych w tym celu urządzeń, oraz założenia strategii Design of Experiment (DoE), stosowanej do optymalizacji procesów syntezy.

Przechodząc do omówienia badań własnych, mgr inż. Michałek na wstępie omówił rezultaty początkowych eksperymentów optymalizacji pierwszego etapu syntezy CPL302415 przy wykorzystaniu reaktora przepływowego. Nie przyniosły one zadowalających efektów, wobec czego zarzucono dalszych prób uznając je za nieuzasadnione.

W odniesieniu do materiału zawartego w artykułach, które weszły w skład recenzowanej pracy doktorskiej, Autor precyzyjnie określił swoją rolę i zakres badań w realizowanych w Celon Pharma pracach badawczo-rozwojowych.

I tak, w toku badań nad otrzymywaniem karbaldehydu **3** będącego prekursorem związku CPL302415, sprawdził kilkanaście znanych metod utleniania alkoholi do aldehydów i zidentyfikował układ katalityczny Pd(OAc)₂/pirydyna jako tani i przyjazny dla środowiska katalizator, możliwy dla zastosowania w technikach przepływowych umożliwiającymi skalowalność procesu. Pomocą w ustaleniu optymalnych warunków reakcji było zastosowanie podejścia DoE. Na podstawie wyników eksperymentów przesiewowych, został wygenerowany liniowy model matematyczny wskazujący, że najważniejszy, pozytywny wpływ na wydajność otrzymywania aldehydu miała ilość użytego katalizatora i nieco mniejszy ale również korzystny, temperatura i prędkość przepływu odczynników, z tym, że prędkość przepływu tlenu wpływała negatywnie, zmniejszając wydajność pożądanego produktu. Dalsze badania optymalizacyjne, z użyciem metodologii DoE (zastosowanie planu centralnego kompozycyjnego (CCD) i metody powierzchni odpowiedzi (RSM)) potwierdziły te wnioski ujawniając jedynie istotny statystycznie efekt dodatni interakcji pomiędzy ilością katalizatora a szybkością przepływu reagentów na wydajność produktu aldehydowego. Ponadto prowadząc reakcje utleniania w różnych rozpuszczalnikach, Doktorant wyznaczył optymalny skład środowiska reakcji otrzymując 84% wydajność przy zastosowaniu mieszaniny toluen/octan etylu 1:1.

Druga praca na wstępie odnosi się do podjętych prób zmniejszenia liczby etapów otrzymywania CPL302415 poprzez redukcję estrowej pochodnej, będącej produktem pierwszego etapu syntezy, do karbaldehydu **3** – bezpośredniego prekursora docelowego związku, pomijając etap otrzymywania alkoholu. Eksperymenty te nie przyniosły zadowalających rezultatów pod względem wydajności i selektywności, a mgr inż. Michałek nieco szerzej omawia ich szczegóły w swoim opracowaniu doktorskim. W związku z tym prace optymalizacyjne zostały skupione na opracowaniu efektywnej metody redukcji estru do pierwszorzędowego alkoholu z wykorzystaniem systemu przepływowego. Prowadząc reakcję uwodornienia grupy estrowej w reaktorze okresowym z użyciem LiAlH₄ Autor otrzymywał jako główny produkt alkohol ze zredukowanym wiązaniem podwójnym w pierścieniu benzimidazolu **2**, który następnie był utleniany do aldehydu, będącego prekursorem docelowego CPL302415. Alkohol ten charakteryzował się gorszą rozpuszczalnością niż pochodna z wiązaniem podwójnym **5**, która z kolei była głównym produktem reakcji redukcji estru w reaktorze przepływowym. W związku z tym w dalszych pracach skoncentrowano się na optymalizacji redukcji w kierunku selektywnego otrzymywania pochodnej **5**, co pozwalało ograniczyć ilość rozpuszczalnika zużywanego w późniejszym procesie utleniania. Wsparte modelami DoE próby z różnymi czynnikami redukującymi nie dały satysfakcjonujących wyników i dopiero zastosowanie przez mgr inż. Michałka glinowodoru litu doprowadziło do ograniczenia możliwości powstawania alkoholu **2**. Co interesujące początkowe rezultaty prowadzonych z użyciem LiAlH₄ eksperymentów nie były zgodne z przewidywaniami wygenerowanych dla tego procesu modeli DoE. Po dokładnej analizie Doktorant przeprowadził syntezę w skali 1 g uzyskując 91% selektywność otrzymywaniażądanego

produktu z wydajnością na poziomie 83%. Wykazał przy tym, że możliwe jest przeprowadzenie ekstrakcji produktu w przepływie z uzyskanej mieszaniny reakcyjnej.

W ostatniej części pracy, która jeszcze nie została opublikowana, Doktorant optymalizował jeden z etapów syntezy związku CPL304110, będącego inhibitorem receptora dla czynnika wzrostu fibroblastów pan-FGFR. Wybrana reakcja prowadzona w reaktorze okresowym trwała 20 h w temperaturze pokojowej, a wydajność otrzymywania produktu wynosiła 73%. Zmiana rozpuszczalnika doprowadziła do uzyskaniem docelowego związku w czasie 10 min. z wydajnością równą 87%. W wyniku zastosowania podejścia DoE i optymalizacji parametrów reakcji w reaktorze przepływowym uzyskano dalsze skrócenie czasu czas reakcji do 2 min. Reakcja została powtórzona w skali 1 g z 84% wydajnością produktu, co było wynikiem zbliżonym do otrzymanego w reaktorze okresowym.

2. Ocena pracy doktorskiej

Pan mgr inż. Stanisław Michałek jest pierwszym autorem we obu pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Opublikowane wyniki badań, przedstawione w tych artykułach zostały już uprzednio pozytywnie zrecenzowane w procesie redakcyjnym czasopism z listy Journal Citation Reports. Stanowią one oryginalne rozwiązania postawionych problemów naukowych i zawierają istotne elementy nowości. Oświadczenia współautorów wskazanych artykułów, dowodzą wiodącej roli Doktoranta w ich powstaniu. Warto jednocześnie odnotować, że Pan mgr inż. Stanisław Michałek jest także współautorem trzech innych publikacji i dwóch doniesień konferencyjnych, co świadczy o Jego znacznej aktywności naukowej.

Optymalizacja syntezy kandydatów klinicznych, jest bardzo ważna z powodów ekonomicznych, procesowych oraz środowiskowych. Wszystkie te aspekty są brane w rozprawie pod uwagę, a wyniki równolegle prowadzonych optymalizacji reakcji w reaktorach okresowych i przepływowych są efektywnie porównane (tabele 4 w pracach A1 i A2), dyskutowane i podsumowane. Dodatkowo, przyczynkowe prace nad optymalizacją poszczególnych reakcji są rozpatrywane w szerszym kontekście całego procesu otrzymywania końcowego związku CPL302415. Szczegółowo uzasadniane, planowane, opisane i dyskutowane kolejne kroki optymalizacji badanych reakcji pokazują od jak wielu czynników zależy otrzymywanie pożądaných produktów z odpowiednią wydajnością i selektywnością. Uważam, że z rozwiązywaniem napotykaných po drodze problemów, Doktorant poradził sobie znakomicie, doprowadzając do opracowania wydajnych, metod możliwych do zastosowania w większej skali w procesach produkcyjnych.

Na szczególne uznanie zasługuje ilość przeprowadzonych eksperymentów, sprawdzanie dodatkowych warunków (np. eksperymenty z wyższymi temperaturami w A1) oraz modyfikacje aparatury (np. miejsce wprowadzenia strumienia tlenu, modyfikacje pierwotnego systemu przez dodanie dwóch kolejnych reaktorów i dodatkowej pompy tłoczącej do nich tlen, próby z dodatkowym mikroreaktorem LTF-MS w A1 oraz mikroreaktora i przepływowej ekstrakcji w A2), które sumarycznie doprowadziły do rozpracowania i zoptymalizowania reakcji otrzymywania pożądaných produktów przejściowych w syntezie docelowego związku CPL302415. W pracy A2 zwróciło moją uwagę umiejętne podejście do problemu niezgodności otrzymaných wyników z modelem teoretycznym dla reakcji w pożądanęj temperaturze 20°C.

Oprócz wyników opisanych w samych publikacjach, należy wspomnieć o bogatych i starannie opracowanych materiałach dodatkowych zawierających szczegóły metodyczne, dodatkowe wyniki eksperymentalne, opisy i zdjęcia aparatury oraz cenne uwagi praktyczne.

Na podkreślenie zasługuje efektywne wykorzystanie podejścia DoE oraz późniejsza interpretacja i wykorzystanie otrzymanych modeli do planowania docelowych warunków reakcji. Autor również bardzo umiejętnie korzysta z dostępnej literatury przy planowaniu kolejnych eksperymentów ale nie ogranicza się do opisywanych przez innych podejść, tylko na tej podstawie wdraża własne rozwiązania. Bardzo cenne jest także rzetelne przedstawianie i interpretacja wyników negatywnych, które m.in. obrazują ograniczenia metod przepływowych i są niezwykle cennymi wskazówkami dla innych naukowców.

Podsumowując, całość opracowania oceniam wysoko, założone cele badawcze zostały osiągnięte, a otrzymane wyniki mają oprócz naukowego niebagatelne znaczenie praktyczne.

3. Uwagi i komentarze

Cel pracy został bardzo krótko i konkretnie zdefiniowany. Wydawać by się mogło, że opracowanie wybranych etapów syntezy obu związków docelowych w procesach przepływowych będzie realizowane w podobnym zakresie. Jednak obie prace stanowiące podstawę pracy doktorskiej dotyczą związku CPL302415. Optymalizacja reakcji kondensacji Claisena w syntezie drugiego związku, opisana na niespełna dwóch stronach, stanowi właściwie dodatek i jako materiał jeszcze nieopublikowany sądzę, że niekoniecznie powinien zostać wymieniony jako w zasadzie równorzędny cel pracy.

Ogólnie, jestem pod wrażeniem umiejętności Autora w treściwym opisywaniu najważniejszych wyników swoich badań. Część opisowa rozprawy stanowi doskonałe wprowadzenie do materiału zawartego w publikacjach. Pewnym zaskoczeniem był jedynie fakt, że alkohol **2**, stanowiący substrat w optymalizowanej w pracy A1 reakcji utleniania, jest jednak produktem niepożądanym we wcześniejszym etapie, tj. reakcji redukcji estru, której przeniesienie do układu przepływowego i optymalizacja warunków jest tematem pracy A2. Informacja o lepszej rozpuszczalności alkoholu **5** (w publikacji A2 związek **2**) w stosunku do **2** (w publikacji A2 związek **2b**) i możliwości dalszej optymalizacji warunków procesu utleniania prowadzącego do kluczowego aldehydu **3**, znajduje się dopiero na końcu opisu poświęconego publikacji A2 (strona 29).

W odniesieniu do materiału opisanego w publikacji A1, zastanawia mnie kwestia kolejności doboru odpowiednich rozpuszczalników w stosunku do optymalizacji pozostałych warunków reakcji. Większość eksperymentów optymalizacyjnych prowadzona była dla mieszaniny toluenu i kaprolaktonu (wszystkie wyniki w tabelach 1–3, tabela S2 (12 z 19 eksperymentów)), podczas gdy wyniki prób z innymi rozpuszczalnikami zamieszczone w materiałach dodatkowych są znacznie mniej liczne (toluen – tabela S1, 9 eksperymentów; DMA – tabela S2, 3 eksperymenty; EtOAc – tabela S2, 3 eksperymenty; toluen/EtOAc 1:1 – tabela S3, 5 eksperymentów i tabela S4, 1 eksperyment). Porównanie wyników eksperymentów prowadzonych w mieszaninie toluen/kaprolakton i toluen/EtOAc, w tych samych warunkach (tabela 2, wiersz 7 i 8 vs tabela S3, wiersz 3 i 4) wskazuje znaczne różnice w wydajności otrzymywania aldehydu **3** w zależności od szybkości przepływu reagentów – dla $V = 0,1$ mL/min 36,3% vs 67,63%, a dla $V = 1$ mL/min 70,4% vs 74,07%. Czy w związku z tym mamy pewność,

że dobrane zostały faktycznie optymalne warunki dla wybranego układu rozpuszczalników toluen/EtOAc 1:1? I czy dodatkowo stosunek mieszaniny rozpuszczalników nie powinien zostać dodatkowo sprawdzony, biorąc pod uwagę, że najwyższą wydajność (89%) otrzymano dla czystego toluenu?

Wyniki przedstawione w pracy A1 w formie graficznej na figurze 4 porównują konwersję i wydajności poszczególnych produktów reakcji utleniania alkoholu **1** w różnych rozpuszczalnikach. Z figury wynika, że w każdym przypadku substrat został całkowicie przekształcony, podczas gdy wyniki zamieszczone w tabelach wskazują, że całkowita konwersja zaszła tylko w reakcji prowadzonej w układzie toluen/EtOAc 1:1 (tabela S4). Rozbieżności pomiędzy wynikami zamieszczonymi na figurze 4 i w tabelach występują również w wydajnościach produktu ubocznego, tj. alkoholu **2**.

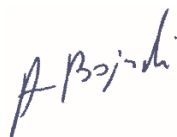
W stosunku do pracy A2, proszę o komentarz na temat wyników powtórzonej reakcji redukcji estru prowadzonej w temp. 0°C (wydajność alkoholu **2** – 70,3% i niepożądanego **2b** – 20,6%) w stosunku do eksperymentu przesiewowego z tabeli 2, wiersz 3 (wydajność **2** – 73,9% i niepożądanego **2b** – 9,2%); szczególnie w odniesieniu do różnicy zaobserwowanej w przypadku **2b**.

Podsumowując, chciałbym zaznaczyć, że powyższe komentarze i uwagi zamieściłem głównie jako tematy do dyskusji na etapie obrony rozprawy doktorskiej.

Drobne niedociągnięcia edycyjne i kilka dodatkowych mniej istotnych pytań i komentarzy naniósłem bezpośrednio w elektronicznej wersji rozprawy.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. inż. Stanisława Michałka zatytułowana „Flow chemistry w syntezie inhibitorów kinaz. Optymalizacja procesu i powiększanie skali”, spełnia wymagania prawne Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2023 r. poz. 742) i z pełnym przekonaniem przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Stanisława Michałka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Andrzej Bojarski