Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Katedra
Technologii Chemicznej Organicznej
i Materiałów Polimerowych

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
tel. (91) 449-42-47, (91) 449-42-20; fax. (91) 449-43-65

Szczecin 18.07.2023 r.

dr hab. inż. Ewa Janus, prof. ZUT

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Stanisława Michałka

pt. „*Flow chemistry w syntezie inhibitorów kinaz. Optymalizacja procesu i powiększanie skali*"

Rozprawa została przygotowana pod opieką dr. hab. inż. Zbigniewa Ochala, prof. uczelni jako promotora i dr. inż. Marcina Zagozdy, jako promotora pomocniczego i przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej.

Podstawą formalną sporządzenia recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej, Pana prof. dr hab. inż. Janusza Zachara, z dnia 25 maja 2023 r.

Przedmiot i cel rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. inż. Stanisława Michałka została zrealizowana w firmie Celon Pharma S.A. jako doktorat wdrożeniowy. Przedstawione w niej badania zostały wspólnie sfinansowane przez Celon Pharma S.A. i NCBiR, w ramach m.in. projektu o nazwie „KICHAI" i działania 1.2. Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój - projekt POIR.01.02.00-00-0085/18-00. Celem tego projektu jest rozwój przedkliniczny oraz ewaluacja kliniczna innowacyjnego inhibitora kinazy 3-fosfatydyloinozytydu (PI3Kδ), do zastosowania w terapii chorób o podłożu immunologicznym oraz chorób o podłożu zapalnym. Dotychczas dostępny na rynku inhibitor kinazy PI3 delta a także wciąż rozwijane nowe, bezpieczniejsze pod względem efektów ubocznych, inhibitory PI3Kδ, są głównie celowane do leczenia chorób onkologicznych. Innowacją na skalę światową firmy Celon Pharma S.A. jest ukierunkowanie opracowania nowych inhibitorów kinazy PI3 delta na nowe cele terapeutyczne. Jednym z takich celów jest toczeń rumieniowaty. Inhibitorem do jego terapii, proponowanym przez Celon Pharma S.A., jest związek CPL302415. Jest on w fazie badań przedklinicznych, których kolejne etapy wymagają odpowiedniej ilości substancji.

Stąd wynika cel rozprawy doktorskiej mgr. inż. Stanisława Michałka. Celem tym było zbadanie możliwości powiększenia skali syntezy związku CPL302415 poprzez zastąpienie procesu okresowego

procesem ciągłym i optymalizacja parametrów poszczególnych etapów syntezy w reaktorze przepływowym. Należy podkreślić, że ścieżka 4-etapowej syntezy substancji aktywnej w procesie okresowym, została opracowana z istotnym udziałem Doktoranta i opisana w publikacji spoza zakresu recenzowanej pracy. Ponadto zamierzeniem Doktoranta w przedstawionej rozprawie, była optymalizacja jednego z etapów syntezy związku CPL304110, inhibitora kinazy FGFR1-3, z zastosowaniem reaktora przepływowego.

Nadrzędny cel i zakres badawczy ocenianej rozprawy skupiał się więc na ustaleniu możliwości przeprowadzenia, w układzie reaktorów przepływowych, szeregu reakcji syntezy substancji aktywnych z grupy inhibitorów kinaz i optymalizacji kolejnych etapów tych syntez z zastosowaniem metody planowania doświadczeń.

Uważam, że cel rozprawy został przez Doktoranta jasno sformułowany, a jego realizacja podparta szeregiem bezdyskusyjnych zalet wykorzystanych narzędzi. Procesy ciągłe, prowadzone w reaktorach przepływowych posiadają bowiem szereg istotnych zalet nad procesami okresowymi i zyskują na znaczeniu w produkcji farmaceutycznej, wymagającej szczególnych, często niebezpiecznych oraz trudnych reagentów i warunków. Procesy te spełniają także kluczowe uwarunkowania projektowania eksperymentów (DoE), wykorzystującego metody statystyczne do optymalizacji, gdyż pozwalają na precyzyjne kontrolowanie wszystkich parametrów i minimalizację błędów pomiarowych. Projektowanie doświadczeń przyspiesza znalezienie optymalnych parametrów, pozwala na zmniejszenie ilości eksperymentów, co przekłada się na mniejszą ilość zużytych surowców, czasu i energii. Stało się więc wzorcową metodologią optymalizacji procesów w przemyśle farmaceutycznym i nie tylko.

Forma rozprawy i jej ocena

Praca przedstawiona mi do recenzji oparta jest na dwóch publikacjach w czasopismach z bazy JCR o współczynniku wpływu IF=3,9 - *RSC Advances* i *Reaction Chemistry & Engineering*, które związane są z opracowaniem warunków dwóch etapów w ścieżce syntezy związku CPL302415 w reaktorze przepływowym. Ponadto rozprawę tworzą nieopublikowane wyniki badań.

Rozprawa ma spójną, dobrze uporządkowaną strukturę. Na 38 stronach Doktorant zawarł streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji z podziałem na wchodzące i nie wchodzące w zakres pracy, spis skrótów, wstęp, cel pracy, omówienie wyników badań, podsumowanie i wykaz bibliografii. Ponadto integralną część rozprawy stanowią dwa artykuły wraz z materiałami uzupełniającymi i oświadczenia współautorów. Pomimo, że artykuły są wieloautorskie, co jest oczywiste z uwagi na szeroki zakres i innowacyjno-wdrożeniowy charakter eksperymentów, realizowanych w firmie Celon Pharma S.A., wymagający współpracy specjalistów z różnych dziedzin, to z załączonych oświadczeń oraz informacji w artykułach jednoznacznie wynika dominujący udział Doktoranta w realizacji postawionego w rozprawie celu badań. Można dostrzec, że mgr inż. Stanisław Michałek jest w zespole głównym specjalistą od syntezy organicznej z wykorzystaniem reaktorów przepływowych.

Na podkreślenie zasługuje zwarta, a zarazem pełna treści forma rozprawy. Streszczenie rozprawy stanowi klarowne wprowadzenie, w którym Doktorant określa potrzebę realizacji podjętej tematyki badawczej, motywuje wybór zastosowanych metodologii i jasno wskazuje własne dokonania.

We wstępie Autor rozwija zagadnienie reaktorów przepływowych, przedstawia istotne elementy ich konstrukcji i oprzyrządowania niezbędnego do prowadzenia procesu ciągłego. Jest to wyczerpująco i sugestywnie przygotowany materiał, bardzo pomocny dla czytelnika, analizujący wady i zalety oraz przeznaczenie różnych rozwiązań technicznych dla procesów przepływowych. Zawarte tu informacje wskazują na obszerną wiedzę praktyczną Doktoranta, wynikającą z pewnością z własnego doświadczenia w użytkowaniu reaktorów przepływowych a także przestudiowanej literatury, która została tu licznie zacytowana. W osobnym podrozdziale, który można także potraktować jako swego rodzaju wstęp, Autor wprowadza w metodologię optymalizacji procesów z zastosowaniem planowania eksperymentów (DoE). Moim zdaniem ciekawym byłoby poznać typy planu doświadczeń i zasady ich doboru ewentualnie odniesienie do tych najczęściej stosowanych w badaniach i najbardziej użytecznych w optymalizacji. Zmniejszenie ilości eksperymentów ma bowiem wyłącznie sens, gdy pracujemy blisko obszaru optimum, czyli parametry brzegowe są szczegółowo i stosowwnie wyznaczone w badaniach wstępnych.

Rozdział zatytułowany „Omówienie wyników badań" stanowi główną część rozprawy i jest poprzedzony celem pracy, w którym autor prezentuje schemat 4-etapowej syntezy związku CPL302415 i odwołuje się do artykułu (publikacja B3 w wykazie osiągnięć) z opracowaniem jej warunków w reaktorze okresowym. Ta część rozprawy to swoisty przewodnik po publikacjach, w którym autor przedstawia wyniki, prowadzi wnikliwą analizę, zapoznaje z własną oceną zastosowanych metod. Ponadto rozdział ten zawiera omówienie wyników nieopublikowanych badań nad optymalizacją w reaktorze przepływowym, dwóch innych reakcji - pierwszego etapu syntezy związku CPL302415 a także etapu kondensacji Claisena w syntezie związku CPL304110. Rozprawę zamyka podsumowanie podkreślające zalety opracowanych warunków syntezy w reaktorze przepływowym w stosunku do procesu okresowego, wraz z oceną możliwości wdrożenia tych procesów.

Treść rozprawy jest w większości przejrzysta i dobrze koreluje z koncepcją i zakresem wykonanych badań i opracowań. Nie odnoszę się w tym miejscu do przedstawienia metodyki pracy, zastosowanych metod, analizy wyników i wniosków zawartych w publikacjach, bo zrobili to już wcześniej uznani międzynarodowi recenzenci. Poza tym recenzenci zarekomendowali publikacje wydawcom renomowanych czasopism. Brakuje mi jedynie rozwinięcia w zakresie przedstawienia metodyki badań kondensacji Claisena w reaktorze przepływowym. Część z nich z pewnością pokrywa się z tymi w zacytowanej literaturze (poz. 88 bibliografii), ale z racji, że wyniki nie zostały jeszcze opublikowane to moim zdaniem tu należało dokładniej opisać zastosowaną metodologię badawczą i analityczną dla procesu prowadzonego w reaktorze przepływowym.

Nieścisłości, które znalazłam w rozprawie dotyczą rys. 3. W jego podpisie zostały zamienione miejscami oznaczenia pompy tłokowej i strzykawkowej. Druga moja drobna uwaga dotyczy symbolu funkcji odpowiedzi modelu matematycznego - na rys. 7 oznaczony jest literą „y" a w tekście „γ" (gamma).

Kolejna dotyczy współczynnika wpływu IF czasopisma *Reaction Chemistry & Engineering*. Zgodnie z informacją na stronie czasopisma i w bazie JCR, wynosi on 3,9 a nie 5,2, jak podaje Autor w rozprawie. Są to drobne niedociągnięcia, które nie wymagają wyjaśnień ze strony Doktoranta.

Ocena merytoryczna rozprawy i osiągnięcia badawcze

W badaniach własnych mgr inż. Stanisław Michałek dążył do przełożenia trzech z czterech etapów syntezy związku CPL302415 z procesu okresowego na proces przepływowy, modyfikując warunki, tak aby technicznie możliwe było zastosowanie reaktora przepływowego, a następnie zoptymalizowanie procesu. Wyniki z badań czwartej, ostatniej reakcji w ścieżce syntezy związku CPL302415 nie wchodzą w zakres rozprawy.

W pierwszym etapie, w reakcji substytucji nukleofilowej pomiędzy (5-chloro-2-etoksykarbonylo-7-morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-*a*]pirymidyną i 2-(difluorometylo)-1*H*-benzimidazolem, w obecności chlorku tetraetyloamoniowego i węglanu potasu, w środowisku DMA, Doktorant zrealizował próby zamiany węglanu na inne zasady, które były rozpuszczalne w środowisku reakcji, a także użył węglanu sodu w postaci złoża na kolumnie. To ostatnie rozwiązanie okazało się najbardziej obiecujące dla realizacji w układzie przepływowym. Ostatecznie jednak ze względu na rozpuszczanie złoża i zatykanie się reaktora kolumnowego a także brak znaczącej poprawy szybkości reakcji ze wzrostem temperatury oraz skrócenia czasu procesu w stosunku do procesu w reaktorze okresowym, Doktorant zrezygnował z dalszej optymalizacji tego etapu syntezy w reaktorze przepływowym. Dlatego zrozumiałym jest, że w przedstawionej rozprawie Autor zawarł wyłącznie syntetyczną analizę uzyskanych wyników, które nie były publikowane.

Najbardziej problematycznym etapem w syntezie związku CPL302415 był trzeci etap, tj. utleniania alkoholu do aldehydu, który opisany został w publikacji A1 zatytułowanej *„Projektowanie eksperymentu (DoE) z wykorzystaniem flow w katalizowanym palladem utlenianiu alkoholu do aldehydu, ważnego prekursora w syntezie inhibitora kinazy 3-fosfoinosytydu (CPL302415)"*. Etap ten, prowadzony z użyciem MnO_2 i DMP w reaktorze okresowym, generował dużą ilość odpadów. Ponadto na powierzchni MnO_2 adsorbował się produkt, co zmniejszało jego wydajność. Dlatego w pierwszej kolejności przebadano szereg innych katalizatorów i metod utleniania, spośród których otrzymanie pożądanego produktu zapewniało użycie octanu palladu jako katalizatora i gazowego tlenu jako utleniacza. Ważnym elementem badań, prowadzonych z wykorzystaniem planowania eksperymentów, stanowiło zapewnienie precyzji i powtarzalności wyników. Warto podkreślić, że Doktorant kompetentnie zaprojektował i dobrał odpowiedni układ reakcyjny, będący jego własnym rozwiązaniem, złożony z czterech reaktorów przepływowych i dodatkowych pomp jako regulatorów przepływu gazu. Taki układ gwarantował lepsze wymieszanie reagentów znajdujących się w różnych fazach i dłuższy czas reakcji, a tym samym dokładność i powtarzalność eksperymentów. Do wyznaczenia najkorzystniejszych warunków Doktorant początkowo wykorzystał sześcioparametrowy plan doświadczeń, który pozwolił wytypować trzy czynniki najistotniej wpływające na wydajność produktu - ilość katalizatora, temperatura i szybkość przepływu reagentów. Te

parametry zastosował w kolejnym planie eksperymentów, tj. centralnym planie kompozycyjnym wraz z metodologią powierzchni odpowiedzi. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniej ustalony wpływ testowanych parametrów. Autor dodatkowo rozwiązał problem odpowiedniego doboru rozpuszczalnika do procesu utleniania, tak aby zapewnić dobrą rozpuszczalność wyjściowego alkoholu, a także otrzymanego aldehydu. Najwyższe wydajności produktu (84%) Doktorant uzyskał stosując mieszaninę toluenu z octanem etylu 1:1. Zaletą opracowanej metody jest znaczące obniżenie ilości generowanych odpadów, nie tylko ze względu na wyeliminowanie stosowanego w procesie okresowym MnO_2, ale także opracowanie zawrotu rozpuszczalnika. Poza tym, w porównaniu do innych metod utleniania, Doktorant osiągnął najwyższą wydajność atomową aldehydu, bliską 92%. Zastosowany układ reakcyjny pozwalał również na użycie do kolejnego etapu syntezy mieszaniny poreakcyjnej bez konieczności izolacji produktu. Opracowana metoda była ponadto mniej energochłonna.

W publikacji A2 pod tytułem *„Rozwój i optymalizacja wysokoefektywnego procesu redukcji estru w reaktorze przepływowym z wykorzystaniem $LiAlH_4$ w syntezie kluczowego półproduktu do otrzymywania inhibitora PI3Kδ (CPL302415)"*, Doktorant zajął się drugim etapem w ścieżce syntezy związku CPL302415, tj. redukcją estru do alkoholu. Słusznie początkowo podjął próby opracowania bezpośredniej redukcji estru do aldehydu, która znacznie upraszczałaby proces. W tym celu przeprowadził doświadczenia zarówno w reaktorze okresowym jak i przepływowym, zmieniając szereg parametrów reakcji, jak rodzaj odczynnika redukującego, czas i temperaturę. Jednak ze względu na uzyskiwanie jedynie alkoholu a nie aldehydu, Doktorant utrzymał dotychczasową ścieżkę syntezy i zdecydował się na optymalizację procesu redukcji estru do alkoholu w reaktorze przepływowym, z użyciem glinowodorku litu w THF-ie. Głównym zamierzeniem Autora było tu uzyskanie wysokiej chemoselektywności przemiany do alkoholu z zachowaniem wiązania podwójnego w pierścieniu benzimidazolu. Produkt taki cechował się bowiem lepszą rozpuszczalnością niż alkohol ze zredukowanym wiązaniem podwójnym. Lepsza rozpuszczalność pozwalałaby na zmniejszenie ilości rozpuszczalnika w dalszych etapach syntezy.

Doktorant do badań reakcji redukcji estru w kierunku alkoholu, wykorzystał komercyjnie dostępne urządzenie, w którym zoptymalizował proces. Znaczącą korzyścią wynikającą z zastosowania reaktora przepływowego była możliwość przeprowadzenia reakcji w temperaturze 20°C, czyli bez konieczności grzania ani chłodzenia i znaczące skrócenie czasu reakcji. Opracowany proces charakteryzował się wysoką produktywnością pożądanego produktu, o lepszej rozpuszczalności i 180-razy większą wydajnością czasoprzestrzenną niż prowadzony w reaktorze okresowym. Ponadto warto zaznaczyć, że Doktorant wykazał możliwość przeprowadzenia ekstrakcji produktu w przepływie z mieszaniny reakcyjnej, co stanowi dodatkowe usprawnienie procesu.

Uważam, że opracowanie warunków kolejnych dwóch etapów syntezy związku CPL302415 w reaktorze przepływowym jest istotnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej mgr inż. Stanisława Michałka. Zmodernizowana metodyka pozwoliła na poprawę wskaźników technologicznych, środowiskowych i ekonomicznych procesu produkcji, tak istotnych przy zwiększaniu skali procesu.

Ostatnia część rozprawy dotyczy optymalizacji reakcji Claisena pomiędzy 4-(3,5-dimetoksyfenylo)but-3-en-2-onem i szczawianem dietylu, w obecności etanolanu sodu. Doktorant informuje, że jest to jeden z etapów w syntezie związku CPL304110, inhibitora pan-FGFR i odwołuje się do publikacji z 2021 roku w czasopiśmie *Eur. J. Med. Chem.*, przedstawiającej badania zrealizowane w Celon Pharma S.A. i dotyczące zaprojektowania serii nowych substancji aktywnych i opracowania ich ścieżek syntezy. Tu nasuwa się pytanie dotyczące zapisu w rozprawie optymalizowanej reakcji (rys. 14). W przywołanej publikacji, kondensację Claisena prowadzono po wcześniejszym uwodornieniu 4-(3,5-dimetoksyfenylo)but-3-en-2-onu do 4-(3,5-dimetoksyfenylo)butan-2-onu, natomiast Autor na schemacie podaje substrat i produkt z wiązaniem podwójnym. Być może ten etap stanowi alternatywną ścieżkę syntezy do przedstawionej w artykule. Trudno jest mi to jednak zweryfikować, gdyż Doktorant przedstawia najważniejsze wnioski z badań reakcji Claisena, bez szczegółowych opisów metodyki i stosowanych surowców. Dlatego na obronie proszę Doktoranta o wyjaśnienie kwestii surowca i drogi syntezy.
Odnosząc się do tego etapu badań można stwierdzić kilka korzyści, które udało się osiągnąć Doktorantowi. Na wstępie, Autor prowadząc reakcję w reaktorze okresowym dobrał rozpuszczalnik, tak aby zapewnić lepszą rozpuszczalność substratu niż w zastosowanym wcześniej etanolu. Ustalił, że mieszanina THF i etanolu nie tylko lepiej rozpuszczała wyjściowy keton, ale także okazała się gwarantować wyższą o 15% wydajność produktu kondensacji niż sam etanol, do tego w znacznie krótszym czasie 10 minut zamiast 20 godzin. Doktorant nie podał jednak jakie były proporcje THF do etanolu. Autor przeprowadzając optymalizację warunków w reaktorze przepływowym z zastosowaniem planowania eksperymentu z trzema czynnikami wejściowymi – temperaturą, czasem i ilością ekwiwalentów szczawianu dietylu i etanolanu sodu, przy równomolowym ich stosunku, wykazał, że reaktor przepływowy pozwala na dalsze skrócenie czasu reakcji do 2 minut. Miało to przełożenie na zwiększenie produktywności do 74,4 g/h i wydajności czasoprzestrzennej do 3720 g/h/m^3.

Rozprawa mgr inż. Stanisława Michałka stanowi opracowanie w zakresie zasadności i możliwości wdrożenia procesu przepływowego oraz zwiększenia skali produkcji związku CPL302415 oraz CPL304110. W podsumowaniu pragnę podkreślić, że Doktorant w pełni zrealizował założony cel optymalizując i opracowując warunki prowadzenia etapów syntezy i proponując rozwiązania techniczne reaktorów przepływowych. Stanowią one podstawę do wdrożenia zmodernizowanej metodologii do syntezy inhibitorów kinaz w większej skali. Opracowane procesy przepływowe posiadają szereg zalet w porównaniu do dotychczas stosowanych reakcji w reaktorach okresowych.

Pan mgr inż. Stanisław Michałek wykazał się dużą wiedzą i nietuzinkowymi umiejętnościami w obszarze prowadzonych badań, stosowanych metod syntezy, technik eksperymentalnych a także w zakresie właściwego doboru i wykorzystania aparatury do prowadzania procesów przepływowych.

Komentarze i uwagi zawarte w recenzji mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na pozytywną ocenę całości rozprawy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Stanisława Michałka pt. „*Flow chemistry w syntezie inhibitorów kinaz. Optymalizacja procesu i powiększanie skali*" wnosi istotny wkład zarówno naukowy jak i praktyczny do rozwoju procesów chemicznych w reaktorach przepływowych i w pełni spełnia wymagania konieczne do uzyskania stopnia doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr inż. Stanisława Michałka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.