



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Chemii Biomateriałów
Katedra Chemii Analitycznej i Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



dr hab. n. farm. inż. Ewa Olędzka

e-mail: eoledzka@wum.edu.pl; tel: (+48 22) 572 0 755
fax: (+48 22) 572 0 784

Warszawa, dn. 9.12.2021 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Pawła Kręciszka
pt. „Opracowanie metod chromatograficznych w optymalizacji
projektowania oraz otrzymywania nowych radiofarmaceutyków”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska zatytułowana „**Opracowanie metod chromatograficznych w optymalizacji projektowania oraz otrzymywania nowych radiofarmaceutyków**” stanowi cykl 2 prac eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej. Prace eksperymentalne zawierają wyniki badań nad optymalizacją metod pozwalających na uzyskanie danych dotyczących parametrów fizykochemicznych pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny takich jak logarytm P, pK_a, opracowania i zwalidowania metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC pozwalającej na zbadanie stabilności wyżej wymienionych pochodnych będących nośnikami niepromieniotwórczych izotopów pierwiastków wykorzystywanych w diagnostyce obrazowej z dziedziny medycyny nuklearnej a także optymalizacji procesu oczyszczania substancji z mieszanin poreakcyjnych lub ekstraktów naturalnych techniką chromatografii absorpcyjnej typu flash w celu usprawnienia procesu otrzymywania czystych chemicznie substancji biologicznie czynnych, niezależnie od przyjętej skali projektu. Z kolei praca przeglądowa przedstawia i podsumowuje

najnowsze dane na temat nowoczesnych radioznakowanych ligandów białkowych stosowanych w diagnostyce i terapii.

Oceniana rozprawa doktorska liczy 82 strony, w której zamieszczone zostały odpowiednio wykaz skrótów (str. 3), wstęp (str. 4-7), cel pracy (str. 8), podjęta problematyka badawcza wraz z uzyskanymi wynikami, którą Doktorant prezentuje w zdefiniowanych i jasnych dla czytelnika podrozdziałach (str. 9-20), rozdział „Podsumowanie i wnioski” (str. 20-22) oraz spis piśmiennictwa liczącego 62 pozycje literaturowe. Dysertację kończą rozdziały „Oświadczenia współautorów” (str. 73-77), lista publikacji stanowiących dorobek naukowy Doktoranta, zarówno tego będącego podstawą rozprawy doktorskiej jak i pozostałego dorobku naukowego, łącznie ze wskazaniem współczynnika oddziaływania *Impact Factor* i punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki a także streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 81 i 82).

Zespół pod kierownictwem Pana Profesora Pawła Szymańskiego z Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi od lat pracuje nad pochodnymi takryny o wielokierunkowym działaniu. Badania te pozwalają na opracowanie substancji o potencjalnym znaczeniu w leczeniu objawów choroby Alzheimera jak również dają nadzieję na opracowanie potencjalnego radiofarmaceutyku do wczesnej diagnostyki tego schorzenia. Modyfikacje struktury takryny dotyczyć mogą połączenia układu 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny za pomocą łańcucha węglowego o różnej długości, z różnymi podstawnikami jako „zimne” analogi potencjalnych radiofarmaceutyków. Zastosowanie do badań wyżej wspomnianych związków ułatwia pozyskanie informacji o właściwościach substancji bez ryzyka ekspozycji na promieniowanie. Istotnie, taką strategię zastosował Doktorant podczas opracowywania badań fizykochemicznych pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny sprzężonych z kwasem jodobenzooesowym posiadającym podstawnik halogenowy jako potencjalnych substancji czynnych w leczeniu choroby Alzheimera, co było tematem publikacji 1 stanowiącej przedmiot dysertacji (Kręcisz P et al. *Biomedical Chromatography*, 2020;34:e4906). Wyżej wymienione związki zostały otrzymane i scharakteryzowane przez zespół Pana Profesora Szymańskiego a opublikowane w *Chemical Biology and Drug Design* w 2018 roku (Skibiński R et al. *Chem. Biol. Drug Des.* 2018;91;505).

W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorant o wyjaśnienie pewnej kwestii; w treści publikacji 1 Doktorant wnosi, że opracowywał właściwości fizykochemiczne serii związków otrzymanych przez Pana Skibińskiego i innych. Dlaczego więc

w recenzowanej dysertacji (strona 10) Doktorant stwierdza, że „Analiza oparta na przesunięciu maksimów absorpcji pod wpływem zmiany pH pozwoliła na precyzyjne określenie wartości pK_a pochodnych tetrahydroakrydyny sprzężonej z kwasem 3,5-dichlorobenzoesowym [pozycja literaturowa 24, Czarna K et al. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21;3765], kwasem 2-jodobenzoesowym, kwasem 3-jodobenzoesowym, kwasem 4-jodobenzoesowym [pozycja literaturowa 25, Krecisz P et al. *Biomedical Chromatography*, 2020;34;e4906 – **czyli publikacja 1**], indometacyną [pozycja literaturowa 26, Zawada K et al. *Chemical Papers*, 2021;75;249] oraz pochodnych cyklopentachinoliny sprzężonej z kwasem 6-chloronikotynowym [pozycja literaturowa 27, Czarna K et al. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20;498]?

Badania przeprowadzone przez Doktoranta wykazały, że pochodne 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny sprzężone z kwasem jodobenzoesowym posiadającym podstawnik halogenowy w pozycji *orto*, *meta* lub *para* wykazywały średni wzrost wartości pK_a 1 oraz spadek wartości pK_a 2 wraz ze wydłużeniem łańcucha węglowego łączącego cząsteczkę pochodnej takryny z kwasem jodobenzoesowym. Istotne dla wartości pK_a miało również miejsce podstawiania, i tak: podstawianie atomu jodu w pozycji *orto* powodowało średnio najniższe wartości pK_a 1 i najwyższe wartości pK_a 2, natomiast pozycja *para* powodowała odwrotną tendencję. W kolejnym etapie badań Doktorant wykazał, że w przypadku wartości $\log P$, długość łańcucha węglowego i ułożenie podstawnika wpływały znacząco na wzrost lipofilowości cząsteczki. Lipofilowość izomerów wzrastała zawsze w kolejności zgodnej z kolejnością podstawienia atomu jodu w pierścieniu aromatycznym kwasu benzoowego. Uzyskane wyniki badań Doktorant porównał z obliczeniowymi wartościami parametrów pK_a 1, pK_a 2 oraz $\log P$ wygenerowanymi przez oprogramowania ALOGPS 2.1 oraz ChemAxon 2018 wnioskując, że były one niższe od tych obliczeniowych. Mgr Kręcisz stwierdził, że powyższe różnice wynikają z faktu, że obie metody obliczeniowe uwzględniły w kalkulacjach wpływ długości łańcucha alkilowego bez uwzględnienia położenia podstawnika w pierścieniu aromatycznym.

W kolejnym etapie badań, Doktorant opracował metodę HPLC pozwalającą na oznaczenie ilościowe związków pochodzących z badania stabilności chemicznej pochodnej tetrahydroakrydyny sprzężonej z kwasem 3-jodobenzoesowym w roztworze (oznaczenie w publikacji 1 jako substancja 3b), będącym w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, w niskim i wysokim pH, podwyższonej temperaturze,

warunkach stresu oksydacyjnego oraz wystawionych na działanie promieniowania UV. Przeprowadzone badania wykazały, że substancja 3b jest trwała w roztworze metanolowo-wodnym przez 24 godziny w temperaturze pokojowej bez dostępu światła oraz jest odporna na czynniki utleniające. Środowisko silnie kwasowe lub silnie zasadowe nie miało wpływu na trwałość cząsteczki w roztworze, natomiast substancja okazała się wrażliwa na promieniowanie UV. W celu rzetelnego przeprowadzenia ww. oznaczeń, Doktorant w pełni zvalidował metodę HPLC zgodnie z protokołem Q2 opublikowanym przez Międzynarodową Radę ds. Harmonizacji. Mgr Kręcisz sprawdzeniu poddał liniowość wraz z zakresem, precyzję, pośrednią precyzję, dokładność, specyficzność, czułość, elastyczność oraz wprowadził testy odpowiedniości systemu monitorujące każdy rozdział w czasie rzeczywistym.

W drugiej części wykonywanych prac badawczych, składających się na kolejną zaprezentowaną w dysertacji publikację naukową (publikacja 2, Kręcisz P et al. *Journal of Chromatographic Science* 2021;bmab097;1), mgr Kręcisz opracował metodę optymalizującą rozdziały chromatografii adsorpcyjnej typu flash wykorzystywanej w celu oczyszczania produktów reakcji. Doktorant w swojej pracy opracowywał metody rozdziału mieszanin poreakcyjnych celem uzyskania czystych pochodnych tetrahydroakrydyny sprzężonych z różnymi związkami (kwasem 3,5-dichlorobenzoesowym, indometacyną i innymi). Związki te zostały otrzymane i scharakteryzowane uprzednio przez zespół badawczy Profesora Szymańskiego (Czarnecka K et al. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020;21;3765; Krecisz P et al. *Biomedical Chromatography*, 2020;34;e4906; Zawada K et al. *Chemical Papers*, 2021;75;249).

Bazując na doświadczeniu naukowym nabytym uprzednio, mgr Kręcisz opracował metody obliczania nachylenia gradientu w rozdziałach preparatywnych techniką chromatografii typu flash dopasowanej indywidualnie do mieszaniny poddawanej rozdziałowi w oparciu o dane pozyskane z chromatogramów TLC i sprecyzowanej na pojedynczy składnik tej mieszaniny. Podstawa obliczeniowa opracowanej przez Autora metody koresponduje z teorią elucji gradientowej przedstawionej przez Jandera i współautorów (*Journal of Chromatography* 1974;91;207; *Journal of Chromatography* 1974;91;223). Rozdziały, w których zastosowano gradient opracowany tą metodą pozwoliły na prawidłowe rozdzielanie składników mieszanin zachowując symetryczny kształt piku niezależnie od zastosowanej techniki podaży próbki. Ponadto dzięki tej metodzie możliwe jest

uzyskanie zawsze tego samego czasu rozdziału mierzonego w objętościach kolumny. Co więcej, opracowana przez Doktoranta metoda pozwala na zminimalizowanie nieoczekiwanego wpływu rozpuszczalnika próbki na kształt pików, co usprawnia i ułatwia proces oczyszczania substancji biologicznie czynnych.

Niezwykle interesującą jest tematyka publikacji 3, również stanowiącej przedmiot przedłożonej dysertacji (publikacja 3, Kręcisz P et al. *Bioconjugate Chemistry* 2021;32;25). W pracy tej Doktorant zebrał najnowsze dane na temat nowoczesnych radioznakowanych ligandów białkowych stosowanych w diagnostyce i terapii. Praca zawiera dane na temat nowo wprowadzonych małych białek, jak i dużych struktur takich jak przeciwciała monoklonalne i została podzielona na sekcje dotyczące strategii receptorowej, radioimmunoterapii wraz z radioimmunodiagnostyką przy użyciu radioznakowanych przeciwciał oraz analizę badań klinicznych radioznakowanych pochodnych białkowych w latach 2008-2018.

Reasumując, tematyka podjęta przez Doktoranta wpisuje się w aktualne kierunki badań chemii medycznej i chemii farmaceutycznej. Badania wchodzące w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej dostarczają narzędzi pozwalających na optymalizację projektowania i otrzymywania nowych struktur związków biologicznie czynnych, w szczególności radiofarmaceutyków dzięki zastosowaniu strategii wykorzystania do badań „zimnych” analogów tych związków.

Na uwagę zasługuje całkowity dorobek naukowy Doktoranta, gdzie obok dwóch doniesień zjazdowych, mgr Paweł Kręcisz jest autorem lub współautorem 10 publikacji z listy czasopism Journal Citation Report oraz 1 publikacji w czasopiśmie polskim nieindeksowanym, przy czym całkowity *Impact Factor* osiągnięty przez Autora wynosi 37,768 i punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki 880. Wprawdzie Doktorant jedynie w 3 z tych prac jest pierwszym autorem, nie umniejsza to jednak ogromu pracy naukowej, wszechstronności i zaangażowaniu w samorozwój.

Z kolei mając na uwadze niniejszą dysertację, chciałabym zauważyć, że wyniki badań je stanowiących zostały opublikowane w 2 publikacjach eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej o łącznym współczynniku oddziaływania *Impact Factor* 8,294. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, zaś jego udział procentowy wskazuje na wiodącą rolę zarówno w opracowaniu koncepcji, wykonaniu badań, jak również w analizie i interpretacji uzyskanych wyników i ostatecznie postawieniu wniosków końcowych.

Pomimo, iż prace wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej mgr farm. Pawła Kręciszka zostały już ocenione przez niezależnych ekspertów danego czasopisma, z obowiązku recenzenta mam kilka dodatkowych pytań i uwag:

1. Doktorant wskazuje na opracowanie metody obliczania nachylenia gradientu w rozdziałach preparatywnych techniką chromatografii typu flash. Nie można jednak odnaleźć w treści rozprawy na czym konkretnie polegało to opracowanie.
2. W publikacji 1 Autor wnosi, że różnice uzyskane między wartościami eksperymentalnymi a obliczeniowymi w przypadku wartości $\log P$ i pK_a wynikać mogą z nie uwzględnienia położenia podstawnika halogenowego w pierścieniu aromatycznym przez metody obliczeniowe. Czy znane są Doktorantowi jakieś doniesienia literaturowe potwierdzające to przypuszczenie?
3. Doktorant wskazuje w publikacji 1, że poddane badaniom fizykochemicznym związki wykazują aktywność biologiczną względem acetylocholinoestraz oraz zapobiegają agregacji β -amyloidu. Dalej wskazuje znaczne różnice między nimi w badaniach wartości, np. $\log P$. Stąd nasuwa się pytanie, czy uzyskane wyniki mogą przekładać się na aktywność biologiczną i potencjał terapeutyczny oraz właściwości farmakokinetyczne związków w warunkach *in vivo*? Mogłoby to tłumaczyć powód, dla którego ostatecznie to związek 3b został poddany dodatkowym badaniom fizykochemicznym (np. stabilność chemiczna).
4. Kwestia badania stabilności chemicznej związku 3b w publikacji 1; na chromatogramie (Rycina 3) zaobserwować można obecność zanieczyszczeń (dodatkowe piki); wprawdzie w publikacji 1 Doktorant nie identyfikuje tych zanieczyszczeń, ale czy mimo to zostały wykonane badania w kierunku określenia rodzaju i struktury chemicznej powstałych dodatkowych związków (np. technika LC-MS, TLC)? Czy zdaniem Doktoranta są to faktycznie zanieczyszczenia czy może produkty degradacji 3-jodo-N-[4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)butyl]benzamidu?
5. W pracy odnaleźć można drobne błędy stylistyczne i interpunkcyjne. Ponadto w bibliografii w wielu miejscach brakuje numerów stron (pozycja 24, 26) lub też podane są one błędnie (pozycja 27). Jak wspomniałam powyżej,

pozycja literaturowa 25 to publikacja 1, która w spisie literaturowym jak i spisie całkowitego dorobku naukowego Doktoranta została podana błędnie. Wedle wydawcy, praca autorstwa Pawła Kręcisz, Kamili Czarneckiej i Pawła Szymańskiego została wydana w czasopiśmie *Biomedical Chromatography* w roku 2020, w tomie 34, numer 10 a nie tomie 9 jak wnosi Autor.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzja praca doktorska mgr farm. Pawła Kręcisz pt. "Opracowanie metod chromatograficznych w optymalizacji projektowania oraz otrzymywania nowych radiofarmaceutyków" spełnia wymagania ustawowe dotyczące rozpraw doktorskich, określone przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn.zm.). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Pawła Kręcisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

ADIUNKT
Zakład Chemii Biomateriałów

dr hab. inż. Ewa Olędzka