



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Prof. dr hab. inż. Barbara Gawdzik

Instytut Chemii

Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

ul. Uniwersytecka 7

25-406 Kielce

b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 17.11.2025

Ocena Pracy doktorskiej Pani mgr Anety Bobowskiej

pt. „IRAK-4 kinase inhibitors as potential therapeutics in immune-oncology diseases dependent on the functioning of the adapter protein MYD88”

Podstawę opracowania stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej, odnośnie powierzenia mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Anety Bobowskiej pt. „Inhibitory kinazy IRAK-4 jako potencjalne związki terapeutyczne w chorobach immuno-onkologicznych zależnych od funkcjonowania białka adaptorowego MYD88” z dnia 30 września 2025 roku.


Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anety Bobowskiej wykonana pod kierunkiem Profesora Piotra Młynarza dotyczy opracowania strategii syntezy oraz kompleksowej charakterystyki pochodnych i w swej strukturze

skutecznych inhibitorów kinazy IRAK-4.

Podjęcie tego typu interdyscyplinarnych badań, łączących molekularne modelowanie, syntezę chemiczną oraz kompleksową charakterystykę biologiczną i fizykochemiczną jest uzasadnione szczególnie wobec rosnących potrzeb opracowania nowych efektywnych metod otrzymywania i modyfikacji strukturalnych, związków biologicznie aktywnych o określonych właściwościach fizykochemicznych wykazujących wyższą stabilność i lepsze właściwości farmakokinetyczne w stosunku do standardowo stosowanych farmaceutyków. Ponadto tematyka badań realizowanych w ramach dysertacji doktorskiej jest odpowiedzią na kluczowe wyzwania współczesnej medycyny, jakimi są między

innymi przeciwdziałanie wzrostowi lekooporności komórek nowotworowych na powszechnie stosowane w terapiach onkologicznych leki, a także ograniczanie niepożądanych skutków ubocznych leków o działaniu przeciwzapalnym i immunomodulującym.

Recenzowana praca doktorska to klasyczne opracowanie o monograficznym charakterze, liczące 149 stron, podzielone zasadniczo na dwie części: literaturową i doświadczalną. Bogato zilustrowana rysunkami (41), schematami (33) oraz tabelami (40) dysertacja zawiera wykaz stosowanych skrótów, co zdecydowanie ułatwia jej lekturę, a także spis treści, podsumowanie i wnioski.

W rozdziale poprzedzającym część literaturową Autorka pracy zamieściła rozdział, w którym wyszczególniła cele i etapy prac badawczych oraz harmonogram zadań, które realizowała w ramach dwuipółletniego projektu badawczego we współpracy z partnerem zewnętrznym. W części literaturowej, która dobrze wprowadza czytelnika w tematykę realizowanych badań na wstępie została opisana struktura domenowa i funkcje biologiczne kinaz białkowych związanych z receptorem interleukiny-1: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 i IKAK-4, których szlak aktywacji odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej. W kolejnych podrozdziałach uwagę czytelnika skupiono na wykazującej najwyższy poziom ekspresji genowej, tytułowej kinazie IRAK-4, której hamowanie stanowi główny cel terapeutyczny w leczeniu chorób autoimmunologicznych, autozapalnych, neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych. Ponadto poza potencjałem terapeutycznym małowcząsteczkowych inhibitorów IRAK-4 Doktorantka przedstawiła aktualny stan badań klinicznych nad inhibitorami IRAK-4, jako potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi i przeciwzapalnymi. Podkreśliła wady inhibitorów IRAK-4, wskazując jednocześnie na istotne kierunki badań nad opracowaniem nowych strategii syntezy ich analogów, wykazujących wyższą skuteczność i selektywność terapeutyczną oraz pożądany profil farmakokinetyczny. Na kolejnych stronach dysertacji doktorskiej zostały omówione związki . Poza parametrami fizykochemicznymi takimi jak: wielkość i konformacja cząsteczki, powierzchnia polarna (PSA), rozpuszczalność i lipofilowość (logP), stabilność metaboliczna, biodostępność i toksyczność, które są kluczowe dla interakcji z celem biologicznym i mają istotny wpływ na profil farmakokinetyczny, zostały przedstawione wybrane

metody syntezy tej klasy połączeń. Następnie Autorka pracy doktorskiej podała przykłady standardowych reakcji cyklizacji, klasyfikując je pod kątem rodzaju wiązania domykającego. Szerzej niż inne reakcje syntezy układów w przypadku której opisała mechanizm i rodzaje najczęściej stosowanych katalizatorów. Część teoretyczną zamyka podrozdział, w którym w formie tabeli wymienione zostały rzadziej stosowane metody cyklizacji.

W kolejnym czwartym rozdziale dysertacji zostały sprecyzowane szczegółowe cele oraz cztery etapy badań wpisanych w realizację pracy:

- zaprojektowanie z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego serii związków charakteryzujących się korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi (ADMET) i wysokim powinowactwem do centrum aktywnego enzymu IRAK-4,
- opracowanie i optymalizacja procesu syntezy pochodnych ze szczególnym uwzględnieniem pod kątem selektywności, wydajności i skali reakcji,
- analiza właściwości fizykochemicznych zsyntezowanych pochodnych determinujących hamowanie aktywności kinazy IRAK-4 oraz analiza korelacji pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną,
- wyselekcjonowanie połączenia o najskuteczniejszym profilu farmakokinetycznym (PK i ADME) ukierunkowanym na hamowanie kinazy IRAK-4 i jego szczegółowa charakterystyka w aspekcie rozpuszczalności, przepuszczalności, selektywności względem innych kinaz IRAK, toksyczności, celem prowadzenia badań przedklinicznych.

Część pracy doktorskiej zatytułowaną „Badania eksperymentalne” Autorka poświęciła omówieniu badań własnych. W pierwszym etapie badań na podstawie modelowania molekularnego z zastosowaniem programu DataWarrior (wersja 5.2.1) dokonała analizy interakcji ligand-białko w obrębie centrum aktywnego kinazy IRAK-4 oraz wskazała miejsca modyfikacji strukturalnych związku E-16, o niskiej aktywności w stosunku do kinazy IRAK-4. W ten sposób, została zaprojektowana seria 39 potencjalnych inhibitorów kinazy IRAK-4 o określonych właściwościach fizykochemicznych (logP, PSA, masa

cząsteczkowa) i profilu farmakokinetycznym (ADME). Ponadto przeanalizowane zostały znane z literatury metody otrzymywania [] ich ograniczenia i zalety, co pozwoliło na wskazanie [] jako selektywnej i wydajnej metody []. Zoptymalizowano warunki [] kątem: rodzaju i ilości katalizatora, rozpuszczalnika, stężenia substratu, temperatury i czasu reakcji, a także zbadano wpływ udziału [] —na wydajność i selektywność []

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiała trzy kilkietapowe strategie syntezy nowych pochodnych [] zawierających w swej strukturze ugrupowanie [] —różniące się rodzajem podstawników aminowych i alkilowych w regionie odpowiedzialnym za tworzenie wiązań []. Spośród zaproponowanych metod otrzymywania pochodnych [] został wybrany czteroetapowy proces. Pierwszym etapem była synteza pochodnej amidowej na drodze sprzęgania [] zawierającą podstawnik [] w pozycji *orto* w obecności []. Następnym etap stanowiła reakcja alkilacji drugorzędową []. Natomiast kolejnym reakcja [] prowadzona w warunkach opracowanych i zoptymalizowanych na podstawie modelowania molekularnego. Ostatnim etapem była reakcja [] w wyniku której zsyntezowano [] które zostały poddane testom na działanie hamujące aktywność kinazy IRAK-4. Ponadto przeanalizowana została zależność pomiędzy strukturą [] —a ich aktywnością biologiczną (IC₅₀) wobec kinazy IRAK-4. Zbadano wpływ rodzaju i długości łącznika na tworzenie []. Podjęta została także próba określenia korelacji pomiędzy aktywnością IC₅₀ a parametrami fizykochemicznymi: lipofilowością (logP) i powierzchnią polarną (PSA) z uwzględnieniem reguł Lipińskiego.

działania (pIC_{50}) i lipofilowości ($\log P$), a tym samym pozwala na kompleksową ocenę jakości zsyntezowanych połączeń pod względem zależności pomiędzy aktywnością a właściwościami sprzyjającymi biodostępności.

W wyniku przeprowadzonych badań, spośród trzydziestu dziewięciu zsyntezowanych


[redacted], Wybrane pochodne zostały poddane testom biochemicznym i komórkowym oraz wieloparametrowej analizie: selektywności kinazowej, przepuszczalności komórkowej, rozpuszczalności kinetycznej oraz toksyczności. Z uwagi na selektywność hamownia tylko 11 spośród 395 zastosowanych w teście kinaz oraz korzystny profil bezpieczeństwa, do dalszych badań *in vitro* i *in-vivo* została wskazana pochodna z ugrupowaniem





[redacted] jako najbardziej obiecujący inhibitor kinaz IRAK-4, spełniająca reguły Lipińskiego. Charakterystyka *in vivo* profilu farmakokinetycznego (PK) [redacted] połączenia E-34 polegała na określeniu kluczowych parametrów farmakokinetycznych (klirens, objętość dystrybucji, okres półtrwania i biodostępność) z wykorzystaniem czterech różnych dróg podawania (doustnego, dożylnego, dootrzewnowego i podskórnego).

Rozdział, w którym Doktorantka zaproponowała kierunki dalszych badań nad optymalizacją profilu farmakokinetycznego, przepuszczalności/transportu, selektywności i aktywności inhibitującej działanie kinazy IRAK-4, poprzedza część IV, podsumowująca badania prowadzone w ramach realizacji głównych celów dysertacji. W podsumowanie prac naukowo-badawczych zostały umiejętnie wplecione uzyskane wyniki i stopień zrealizowania zdefiniowanych wstępnych założeń.

W części eksperymentalnej Autorka pracy doktorskiej zamieściła ogólne informacje na temat stosowanych odczynników chemicznych, opisy procedur przeprowadzonych syntez wraz z charakterystyką spektroskopową dla wybranych związków. W rozdziale tym zostały wymienione również metody, które wykorzystwała w celu monitorowania reakcji, a także metodyka badań biologicznych przeprowadzonych przez firmy zewnętrzne: [redacted]

Przechodząc do uwag, które wynikają z powierzonej mi roli recenzenta, pragnę zauważyć, że sposób cytowania literatury, w mojej opinii, utrudnia jej lekturę, z uwagi

na fakt, iż w wielu przypadkach dla konkretnej publikacji przypisano kilka (nawet kolejnych) numerów: np. publikacji autorstwa Lin-Chong Su, Wang-Dong Xu i An-Fang FangHuang przypisano numery 1, 2, 3 i 52, natomiast publikacja G.W. Rhyasen, D.T. Starczynowski została zacytowana w tekście pracy z numerami 5, 8, 17, 18, 21. Założenia i cele pracy doktorskiej zostały szczegółowo przedstawione w rozdziale czwartym, zaatutowanym „Cele pacy doktorskiej”, w związku z powyższym Autorka niepotrzebnie wspomina o nich dodatkowo w innych rozdziałach np. w rozdziale 1.1, 2.3.1.1 oraz 2.3.1.4. Uważam, że w podrozdziale 2.3.1.2, poświęconym małowcząsteczkowym inhibitorom kinazy IRAK-4, zabrakło przykładów cytowanych w tekście pochodnych i .

W pierwszym zdaniu podrozdziału 5.2.2.3. (strona 58) Autorka powołuje się na dane mające wpływ na stabilność i reaktywność katalizatorów rutenowych, które czytelnik znajduje w tabeli 13 i 14, zamieszczonych dopiero na stronach 60 i 61. W tym samym rozdziale 5.2.2.3. Autorka pracy lakonicznie wspomina o innych stosowanych katalizatorach, które powinna była wymienić. Ciekawym powodem wyboru katalizatora  była jego „obecność w laboratorium”. Nie znajduję uzasadnienia zamieszczenia na stronie 68 nieczytelnego fragmentu widma ^1H NMR związku E-02, na którym trudno dopatrzeć się rodzaju sygnałów generowanych przez ; a wyznaczenie stałych sprzężenia J nie jest możliwe. Schemat 30, na którym zilustrowano trzyetapową metodę otrzymywania pochodnej anilinowej I-32-R, zawiera błędny ogólny wzór aminy i alkoholu tzn. podano, że $X=N,O$, podczas gdy X-em jest grupa $-\text{NH}_2$ lub $-\text{OH}$. W przypadku komercyjnie niedostępnych drugorzędowych  których procedury otrzymywania zostały opisane w części eksperymentalnej, poza dwoma wyjątkami, nie podano danych spektroskopowych potwierdzających ich budowę. W przypadku, gdy związki są znane, to zwyczajowo cytuje się literaturę, w której można znaleźć metodę ich otrzymywania oraz dane spektroskopowe. W kwestii potwierdzenia budowy chemicznej, zwłaszcza nowych nieopisanych w literaturze połączeń, za konieczne uważam przedstawienie kompleksowej charakterystyki strukturalnej. Szkoda, że w części eksperymentalnej, w przydatku nowych pochodnych  E-4, E-6, E-14, E-22

Doktorantka nie podała wyników analizy spektroskopowej ^1H NMR. Ponadto, zabrakło również danych spektroskopowych ^{13}C NMR.

Podczas publicznej obrony proszę o wyjaśnienia, które zoptymalizowane parametry reakcji [redacted] były określone doświadczalnie, a które na podstawie analizy danych literaturowych.

Autorka podczas redakcji pracy doktorskiej nie uniknęła błędów stylistycznych w postaci powtarzania tych samych lub podobnych zagadnień tylko nieco innymi słowami, a także błędów natury edytorskiej, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Istotnym uzupełnieniem tematyki badawczej i prowadzonych we współpracy [redacted] prac naukowo-badawczych byłoby zamieszczenie wykazu dorobku naukowego Autorki pracy doktorskiej.

Oceniając wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że w mojej opinii, do najważniejszych osiągnięć naukowych Pani mgr Anety Bobowskiej należy zaliczyć:

- zaprojektowanie strategii syntezy trzydziestu dziewięciu nowych, nie opisanych w [redacted] pochodnych zawierających w swej strukturze ugrupowania [redacted], o potencjalnym działaniu inhibicyjnym wobec kinazy IRAK-4,
- zoptymalizowanie warunków prowadzenia procesu syntezy, takich jak: temperatura, czas reakcji, rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika, czy ilość i rodzaj katalizatora,
- analiza korelacji pomiędzy strukturą zsyntezowanych pochodnych [redacted] a aktywnością inhibicyjną wobec kinazy IRAK-4 oraz określenie optymalnych właściwości fizykochemicznych (masy cząsteczkowej, powierzchni polarnej (PSA), zakresu lipofilowości i aktywności lipofilowej (logP i LipE)) determinujących wysoką aktywność biologiczną (IC_{50}) i korzystne właściwości farmakokinetyczne,
- wyselekcjonowanie na podstawie wyników testów biochemicznych i komórkowych oraz analizy porównawczej selektywności kinazowej,

przepuszczalności komórkowej, rozpuszczalności kinetycznej i toksyczności,

o wysokiej w zakresie nanomolowym aktywności inhibitującej działanie kinazy IRAK-4, a tym samym znacznym potencjale terapeutycznym, oraz wskazanie kierunków optymalizacji profilu farmakokinetycznego (PK) decydującego o kwalifikacji do kolejnego etapu badań przedklinicznych.

Analizując cele sprecyzowane przez Doktorantkę oraz założone kierunki badań nie mam wątpliwości, że tematyka prowadzonych w ramach dysertacji doktorskiej badań jest ważna i ciekawa, a uzyskane wyniki, niezaprzeczalnie mają wartość poznawczą i aplikacyjną dla opracowania skutecznych strategii terapii immunoonkologicznych.

Zaprezentowany w dysertacji doktorskiej materiał eksperymentalny z wykorzystaniem tabel, wykresów, schematów reakcji i rysunków ilustrujących dokowanie molekularne białko-ligand, świadczy o dużym nakładzie pracy, jaki Pani mgr. Aneta Bobowska włożyła w realizację założonych celów. Natomiast umiejętne połączenie danych teoretycznych i eksperymentalnych, jak również wnikliwa i logiczna dyskusja wyników oraz przekonująca argumentacja odnośnie wyboru *.....* jako potencjalnego kandydata do dalszych etapów badań przedklinicznych świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja autorstwa Pani mgr Anety Bobowskiej zatytułowana: „Inhibitory kinazy IRAK-4 jako potencjalne związki terapeutyczne w chorobach immunoonkologicznych zależnych od funkcjonowania białka adaptorowego MYD88” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). W związku z powyższym z całym przekonaniem przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anety Bobowskiej do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

Prabone Gwóźdź