



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 9 maja 2023 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. farmacji Wojciecha Lewandowskiego,

doktoranta w Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,

zatytułowanej

„Asymetryczna metoda wytwarzania nowego inhibitora mdm2”,

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. nauk farmaceutycznych Macieja Dawidowskiego jako promotora oraz
dr inż. Iwony Kalinowskiej jako promotor pomocniczej.

Recenzja została opracowana na zlecenie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w oparciu o art. 187
Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Prace badawcze opisane w przedstawionej rozprawie zostały zrealizowane w ramach programu MEN pt.
„Doktorat wdrożeniowy” we współpracy z firmą Adamed Pharma S.A.

Synteza chemiczna jest kluczowym elementem procesu odkrywania i rozwoju nowych leków. Na drodze syntezy chemicznej otrzymywane są nowe cząsteczki, spośród których w wyniku przeprowadzonych badań biologicznych, wyłaniany jest kandydat na lek. Na poszczególnych etapach zadania syntetyczne mają różny charakter, w początkowych etapach priorytetem jest dostarczanie w jak najkrótszym czasie wielu związków, syntetyzowanych w niewielkich ilościach. W dalszych etapach skala syntezy rośnie wraz z ilością i charakterem wykonywanych dla poszczególnych związków badań i zmieniają się w związku z tym stosowane metody syntetyczne. Szczególnym wyzwaniem jest otrzymanie na dużą skalę czystych enancjomerów. To niełatwe wyzwanie podjął w swojej pracy mgr Wojciech Lewandowski. Przedmiotem jego badań był inhibitor interakcji między białkami mdm2 i p53, cząsteczka AD-021.32, otrzymana w firmie Adamed Pharma S.A. i wytypowana do zaawansowanych badań przedklinicznych. Cząsteczka ta posiada

jedno centrum stereogeniczne, a jego konfiguracja (izomer *S*) jest kluczowa dla aktywności biologicznej. Dotychczas stosowane metody, polegające na otrzymywaniu mieszaniny racemicznej i jej rozdziale chromatograficznym, z uwagi na niską wydajność i wysoki koszt, nie mogą być zastosowane w syntezie na większą skalę. Z punktu widzenia dalszego rozwoju cząsteczki AD-021.32, istotnym elementem jest opracowanie jej asymetrycznej syntezy na skalę laboratoryjną z uwzględnieniem aspektów kluczowych dla ścieżki komercyjnej, m.in. niskiego kosztu całkowitego syntezy, bezpieczeństwa substratów czy niskiego poziomu odpadów.

Wychodząc naprzeciw tym założeniom, Doktorant określił jako nadrzędny cel pracy „zaprojektowanie i opracowanie pierwszej, kompletnej, czystej patentowo metody syntezy asymetrycznej związku AD-021.32”. Dodatkowo, założył możliwość optymalizacji opracowanej syntezy związku na skalę laboratoryjną, mając jednocześnie na względzie potencjał do wykorzystania jej w syntezie na skalę przemysłową.

We wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej Doktorant doskonale nakreślił tło i jednocześnie przedstawił uzasadnienie dla prowadzonych badań. W bardzo przystępnej formie opisał znaczenie interakcji pomiędzy białkami mdm2 i p53 dla rozwoju nowotworów i opisał możliwości ingerencji w te interakcje, skupiając się przede wszystkim na małowcząsteczkowych inhibitorach. Doktorant dokonał szczegółowego przeglądu związków, które aktualnie znajdują się w badaniach klinicznych i opisał te o najwyższej efektywności i korzystnym profilu bezpieczeństwa, wskazując jednocześnie, iż mimo intensywnych badań żaden z inhibitorów mdm2 nie został dotychczas wprowadzony do terapii.

Zasadniczą część wprowadzenia stanowi przegląd metod syntezy asymetrycznej pochodnych 3-aminooksindoli oraz spirocyklicznych oksindolo- γ -laktamów. Opisane w literaturze metody syntezy tych związków były podstawą do opracowania przez Doktoranta enancjoselektywnej syntezy szkieletu 1,1',2,5'-tetrahydrospiro[indolo-3,2'pirolo]-2,5'-dionu, występującego w związku AD-021.32. Autor podzielił metody syntezy 3-aminooksindoli pod kątem rodzaju substratu użytego do reakcji oraz rodzaju wiązania powstającego w obrębie czwartorzędowego centrum stereogenicznego, a wśród metod syntezy spirocyklicznych oksindolo- γ -laktamów opisał reakcje addycji α,β -nienasyconych aldehydów do ketimin oraz addycję pochodnych 3-aminooksindoli do α,β -nienasyconych związków karbonylowych.

Lektura tej części rozprawy doktorskiej jednoznacznie wskazuje na doskonałe zrozumienie aspektów biologicznych prezentowanego tematu jak i swobodne poruszanie się w zaawansowanych zagadnieniach chemicznych dotyczących metod syntezy asymetrycznej. Stanowi ona podstawę do **potwierdzenia spełnienia wymogu zawartego w art. 187 pkt.1 Ustawy: Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach (...).**

Na podstawie przeglądu literatury przedstawionego we wprowadzeniu, przy uwzględnieniu założonych kryteriów obejmujących przede wszystkim dostępność i koszty substratów i katalizatorów oraz uzyskanie wysokiego nadmiaru enancjomerycznego, Doktorant opracował 12 strategii syntetycznych, które potencjalnie mogłyby prowadzić do otrzymania związku AD-021.32 w postaci enancjomeru S. Strategie te, oparte o przekształcenia o charakterze stereoselektywnym, zostały przedstawione w postaci ogólnego schematu, który stanowi doskonałą legendę i bardzo ułatwia poruszanie się po części badawczej pracy. Jest to bowiem część bardzo obszerna, opisująca 1239 eksperymentów, w trakcie których Doktorant zweryfikował 42 zaprojektowane ścieżki syntetyczne, opisał procesy optymalizacji i zmiany podejścia syntetycznego wynikające z licznych trudności, na jakie natrafił podczas realizacji pracy. Trzy z opisanych metod doprowadziły do uzyskania związku AD-021.32 w postaci racematu. Spośród nich Doktorant do dalszych etapów badań, obejmujących zastosowanie katalizatorów chiralnych i optymalizację syntezy asymetrycznej oraz skalowanie, wybrał jedną, oznaczoną jako S6V1. W wyniku wieloparametrowego procesu optymalizacji, Doktorant otrzymał związek AD-021.32 o czystości 98,5% z 89% nadmiarem enancjomerycznym i całkowitą wydajnością wynoszącą 20%. Otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań syntetycznych półprodukty, produkty końcowe, wyizolowane zanieczyszczenia i zsyntezowane ligandy chiralne zostały scharakteryzowane na podstawie wyników analiz UPLCMS i NMR. Oprócz prac syntetycznych mgr Wojciech Lewandowski opracował również metodę HPLC pozwalającą na ocenę czystości chiralnej wybranych związków, tym samym poszerzając wachlarz swoich umiejętności o metody analityczne.

Część badawczą kończy przejrzyste, syntetyczne podsumowanie połączone z dyskusją dotyczącą dalszych badań, jakie mogłyby prowadzić do otrzymania czystego enancjomerycznie związku AD-021.32.

Procedury syntetyczne i analityczne zostały szczegółowo i rzetelnie opisane w części eksperymentalnej pracy. Wskazują one jednoznacznie na niezwykle szeroką wiedzę, pozwalającą Doktorantowi na rozwiązywanie skomplikowanych problemów z zakresu syntezy chemicznej, bardzo bogaty warsztat doświadczalny obejmujący szeroką gamę technik laboratoryjnych, samodzielność oraz umiejętność interpretacji wyników analiz, z których na szczególną uwagę zasługują zaawansowane widma korelacyjne NMR.

Do najistotniejszych osiągnięć Doktoranta zaliczyć należy:

1. Zaprojektowanie 47 ścieżek syntetycznych potencjalnie prowadzących do otrzymania związku AD-021.32.
2. Eksperymentalne opracowanie trzech nowych ścieżek syntezy związku AD-021.32 w postaci mieszaniny racemicznej.
3. Eksperymentalne opracowanie ścieżki syntetycznej S6V1, która spełnia większość wymagań postawionych przez Doktoranta w założeniach pracy, dzięki czemu stanowi przewagę nad pierwotną metodą syntezy tego związku.

4. Optymalizacja ścieżki S6V1, która doprowadziła do otrzymania związku AD-021.32 o czystości 98,5% z 89% nadmiarem enancjomerycznym i całkowitą wydajnością wynoszącą 20%.
5. Opracowanie nowej metody [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]
6. Zaprojektowanie i otrzymanie nowego chiralnego liganda [REDACTED].

Wskazane powyżej osiągnięcia mają charakter nowatorski i w sposób jednoznaczny potwierdzają, że w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej dokonano sformułowania, a następnie oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wypełniając tym samym wymagania art. 187 pkt. 2: *Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (...).*

Pod kątem technicznym, przedstawiona rozprawa została opracowana w klasycznej formie obejmującej wprowadzenie, założenia i cel pracy, część badawczą, część eksperymentalną oraz bibliografię obejmującą 229 pozycji literaturowych. Całość to 383 strony, które oprócz tekstu zostały urozmaicone 34 rysunkami prezentującymi przede wszystkim schematy omawianych ścieżek syntetycznych oraz 106 tabelami zawierającymi dane dotyczące warunków optymalizacji reakcji. Dla ułatwienia czytelnikowi nawigacji po pracy, dołączone zostały również wykazy skrótów i symboli oraz spis rysunków i tabel. W tak obszernym tekście trudno uniknąć drobnych błędów edytorskich, literowych czy interpunkcyjnych, które nie wpływają jednak na jakość rozprawy. Jedynym, powtarzającym się, na który chciałabym zwrócić uwagę, jest zapis oznaczeń miar po wartościach liczbowych, a konkretnie kwestia stawiania pomiędzy nimi spacji, Rada Języka Polskiego zaleca następującą regułę dotyczącą tego zapisu: „między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy”.

Pytania, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy doktorskiej i o których przedyskutowanie chciałabym prosić Doktoranta są następujące:

1. Praca w znacznej mierze opiera się na wieloparametrowych optymalizacjach reakcji chemicznych. Jaką metodą Doktorant planował proces optymalizacji poszczególnych etapów, czy używał technik i/lub oprogramowania służących optymalizacji reakcji, takich jak np. *design of experiments (DoE)* lub *kinetic modeling*?
2. Jakie kryteria przyjął Doktorant podczas podejmowania decyzji dotyczących kontynuowania prac badawczych/optymalizacji poszczególnych etapów? Przykładowo, dlaczego nie podjął dodatkowych prób otrzymania związku 28, mimo że sam zauważył, że przyczyną dla której reakcja nie zaszła mogło być niezachowanie ściśle bezwodnych warunków?
3. Czy dzisiaj, biorąc pod uwagę ogrom doświadczeń jakie Doktorant ma za sobą, mógłby stwierdzić, że wśród wszystkich zaprojektowanych ścieżek syntetycznych były takie, które nie miały istotnych szans

na powodzenie? Czy też nie dało się tego przewidzieć i konieczna była weryfikacja eksperymentalna?

Reasumując, **oceniana rozprawa doktorska** stanowi oryginalny i indywidualny wkład doktoranta w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych i spełnia ona wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.). Warto wspomnieć, że Pan mgr Wojciech Lewandowski od niemal 10 lat pracuje w firmie Adamed Pharma S.A. jako specjalista d.s. syntezy organicznej. Jest on pomysłodawcą metody wytwarzania pochodnych 1,1',2,5'-tetrahydrospiro[indolo-3,2'-pirolo]-2,5'-dionu, do których należy związek AD-021.32 i współautorem patentów, w których ta metoda została opisana. Niezwykle wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej i wieloletnie doświadczenie w pracy badawczej świadczą jednoznacznie o tym, że mgr Wojciech Lewandowski jest specjalistą w omawianej dziedzinie, a jego awans na stopień doktora jest w pełni uzasadniony.

Mając na uwadze wszystkie powyższe fakty, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Lewandowskiego i dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dokument zweryfikowano:

pod kątem ujawnienia informacji merytorycznych i zgodności z polityką ochrony własności przemysłowej Adamed Pharma S.A. zweryfikował rzecznik patentowy - Daniel Sulikowski

Daniel Sulikowski

Elektronicznie podpisany przez
Daniel Sulikowski
Data: 2023.05.22 12:31:41 +02'00'

pod kątem zgodności z wewnętrzną procedurą ochrony bezpieczeństwa informacji Adamed Pharma S.A. zweryfikował Kierownik Działu Bezpieczeństwa Informacji - Daniel Grudzień

**Daniel Wiesław
Grudzień**

Elektronicznie podpisany przez
Daniel Wiesław Grudzień
Data: 2023.05.22 13:19:52 +02'00'

pod kątem zgodności z obowiązkami partnera, wynikającymi z umowy trójstronnej dla Adamed Pharma S.A. zweryfikowała Dyrektor Badań i Rozwoju - Anna Terlecka

Anna Maria Terlecka

Elektronicznie podpisany przez
Anna Maria Terlecka
Data: 2023.05.22 12:45:05 +02'00'