



dr hab. Tomasz Gośliński

Poznań, dnia 7 maja 2014 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Kinetyczny rozdział (R,S)-ibuprofenu z zastosowaniem lipaz z *Candida rugosa* w formie wolnej oraz immobilizowanej**

Imię i nazwisko: **mgr farm. Tomasz Siódmiak**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Katedra i Zakład Chemii Leków,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Promotor: **dr hab. Michał Marszałł**

Tematyka badawcza, dotycząca szeroko rozumianej chemii leków z uwzględnieniem zaawansowanych metod analitycznych, podjęta przez Pana mgr Tomasza Siódmiaka jest rozwijana od kilku lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pana dr hab. Michała Marszałła. Doktorant podjął się wykorzystania metod biokatalitycznych, dokładnie działania biokatalitycznego lipaz z *Candida rugosa*, do rozdziału kinetycznego (R,S)-ibuprofenu. Sformułowane w temacie pracy zagadnienia badawcze dotyczące rozdziału kinetycznego (R,S)-ibuprofenu są niezwykle ważne, gdyż dotyczą w istocie występującego w analityce farmaceutycznej od kilkudziesięciu już lat trendu dotyczącego badań czystości enancjomerycznej. Od ponad już 20 lat zagadnienia czystości analitycznej substancji leczniczej uwzględniane są w regulacjach instytucji rządowych, porządkowane wytycznymi REACH i przepisami w zakresie ochrony środowiska zatwierdzonymi przez Stany Zjednoczone, Japonię i Unię Europejską. Działania te spowodowały znaczny spadek sprzedaży leków w formie racemicznej, przy wzroście udziału leków zawierających czyste enancjomery substancji leczniczych. Konieczność oznaczania czystości enancjomerycznej substancji aktywnych biologicznie wynika z faktu, że związki optycznie czynne różnią się między sobą nie tylko farmakodynamicznymi, ale i farmakokinetycznymi aspektami, które przekładają się na skuteczność działania i profile działań niepożądanych. Z tego względu tematyka badawcza skupiona wokół związków chiralnych jest bardzo aktualna, gdyż dotyczy pozyskiwania substancji leczniczych dla celów farmaceutycznych, posiadających pożądaną czystość, a więc jakość, a tym samym efektywność działania i bezpieczeństwo stosowania. Wydaje się, że obecnie stereochemia leków, jak i technologia nowych postaci równie

znacząco wpływają na wprowadzanie nowych leków do lecznictwa. Badania naukowe wyposażyły nas w różne metody pozyskiwania związków enancjomerycznie czystych. W syntezie substancji leczniczych wykorzystywane są powszechnie homochiralne związki naturalne, synteza asymetryczna i rozdział kinetyczny mieszanin racemicznych. Rozdział kinetyczny opiera się już niemal od dwudziestu lat na chiralnych kompleksach opracowanych przez Jacobsena wykorzystywanych w syntezie stereoselektywnej oraz metodach biokatalitycznego wydzielenia czystych enancjomerów z racematów, co zostało wykorzystane w pracy doktorskiej. W metodach biokatalitycznych duże znaczenie odgrywają enzymy z klasy hydrolaz – lipazy, które znane są z aktywności katalitycznej w reakcjach estryfikacji, ale i hydrolizy estrów oraz amidów. Dokonany przez Doktoranta wybór lipazy z *Candida rugosa* jest bardzo uzasadniony, gdyż enzym ten należy do dobrze zbadanych i cechuje go potwierdzona enancjoselektywność w stosunku do chiralnych kwasów z centrum asymetrii przy węglu alfa. Dzięki technikom immobilizacji izolowanych z grzybów i bakterii lipaz, enzymy te są dostępne w formie oczyszczonych produktów białkowych oraz w postaci immobilizowanej, co pozwala na ich wielokrotne wykorzystanie.

Rozprawa doktorska Pana mgr farm. Tomasza Siódmiaka stanowi bardzo spójny tematycznie zbiór czterech publikacji opatrzonych obszernym 35 stronicowym komentarzem. Doktorant załączył ponadto (i) Curriculum Vitae, (ii) Oświadczenia autorów o ich udziale w publikacjach oraz (iii) Prawa autorskie do materiałów wykorzystywanych w pracy. Praca doktorska zawiera wszystkie wymagane rozdziały tj. wstęp, część teoretyczną, cel pracy, dyskusję najważniejszych osiągnięć, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz rycin oraz publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Pracę czyta się bez trudu i z przyjemnością. Kolejność rozdziałów w rozprawie, cytowane piśmiennictwo i streszczenie nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Praca została napisana poprawnym językiem naukowym i jej układ jest prawidłowy. Rozprawa zawiera szereg rycin i tabel, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Nie mam zastrzeżeń co do doboru i wykorzystania źródeł zarówno w publikacjach, jak i przygotowanym do nich komentarzu. Piśmiennictwo komentarza liczy 60 odnośników literaturowych, odpowiednio dobranych i pochodzących w większości z ostatnich 10 lat.

Treść rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Siódmiaka, jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został poprawnie zrealizowany w czterech publikacjach i podsumowany we wnioskach oraz streszczeniu. Doktorant dokonał właściwego wyboru tematyki do **wstępu i części literaturowej**, które poruszają następujące zagadnienia: (i) metaboliczna chiralna inwersja (R,S)-ibuprofenu, (ii) kinetyczny rozdział związków

chiralnych, (iii) lipazy z *Candida rugosa* jako biokatalizatory kinetycznego rozdziału (R,S)-ibuprofenu, (iv) superparamagnetyczne nanocząstki jako nośniki do immobilizacji lipaz z *Candida rugosa* i stanowią zwarte oraz bardzo kompletne kompendium. Sprawia ono, że podjęte w dalszych częściach pracy zagadnienia, zdefiniowany cel, komentarz do publikacji i wnioski wydają się naturalnie wpisywać w poruszane problemy. Zaplanowane przez Doktoranta w celu pracy badania objęły wykorzystanie lipaz z *Candida rugosa* w formie wolnej oraz immobilizowanej na magnetycznych nośnikach jako biokatalizatorów w kinetycznym rozdziale (R,S)-ibuprofenu. Cel ten był realizowany poprzez (i) ocenę aktywności katalitycznej różnych lipaz z *Candida rugosa* w formie wolnej, (ii) immobilizowanie lipaz na komercyjnie pozyskiwanych nośnikach oraz syntetyzowanych i funkcjonalizowanych powierzchniowo ultracienkimi osłonkami chitozanowymi i polimerowymi, (iii) wykonanie kinetycznego rozdziału (R,S)-ibuprofenu na drodze reakcji estryfikacji z wykorzystaniem lipazy immobilizowanej i natywnej, wraz z oceną jej aktywności w kolejnych cyklach reakcyjnych oraz aktywności lipolitycznej, odzysku aktywności i stabilności katalitycznej, (iv) optymalizację rozdziału chromatograficznego (R,S)-ibuprofenu i jego estrów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz chiralnych faz stacjonarnych.

Doktorant dokonał trafnego wyboru metod analitycznych, a następnie przeprowadził ich walidację. Sposób wykonania badań przedstawiony w publikacjach wskazuje na biegłość Doktoranta w stosowanej metodologii i dokumentowaniu wyników. Pan mgr Tomasz Siódmiak krytycznie przedyskutował w publikacjach uzyskane dane eksperymentalne. Szczegółowe badania i ich wyniki znajdujące się w poddanych ocenie pracach dotyczą:

(i) **Publikacja 1** – Curr. Org. Chem. 16 (2012) 973-977 – optymalizacji warunków reakcji (alkohol, rozpuszczalnik, temperatura, czas, dodatek N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu) kinetycznego rozdziału (R,S)-ibuprofenu z zastosowaniem trzech lipaz z *Candida rugosa* w formie wolnej, walidacji metod chromatograficznych z udziałem układów chiralnych z równoczesnym oznaczeniem substratów i produktów podczas jednej analizy;

(ii) **Publikacja 2** – Catal. Commun. 24 (2012) 80-84 – opracowania dwóch metod immobilizacji lipaz z *Candida rugosa* z wykorzystaniem aldehydu glutarowego i chlorowodoru N-etylo-N'-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu – soli sodowej N-hydroksysulfoimidu kwasu bursztynowego; kinetycznego rozdziału (R,S)-ibuprofenu z zastosowaniem lipaz immobilizowanych na nośnikach magnetycznych; badań odzysku nośników magnetycznych ze środowiska reakcyjnego i ponownego zastosowania w cyklach katalitycznych;

(iii) **Publikacja 3** – J. Mol. Catal. B: Enzym. 94 (2013) 7-14 – immobilizacji lipazy z *Candida rugosa* na superparamagnetycznych nanocząstkach modyfikowanych biozgodnymi stabilizatorami wielkocząsteczkowymi - chitozanem i polimerem amfifilowym oraz sieciowanych epichlorohydryną dla kinetycznego rozdziału (R,S)-ibuprofenu, optymalizacji rozdziału chromatograficznego (R,S)-ibuprofenu z użyciem chiralnych faz stacjonarnych; określenia ilości unieruchomionej lipazy, aktywności lipolitycznej i odzysku aktywności enzymu;

(iv) **Publikacja 4** – Appl. Surf. Sci. 288 (2014) 641-648 – charakterystyki fizyko-chemicznej (w tym analizy w podczerwieni – FT IR, termogravimetrycznej – TGA, dyfraktometrii rentgenowskiej - XRD i obrazowania mikroskopowego – SEM, TEM) nośników superparamagnetycznych pokrytych w różnych stosunkach wagowych chitozanem i polimerem amfifilowym, a sieciowanych aldehydem glutarowym wraz z oceną ich stabilności enzymatycznej; badań aktywności lipolitycznej lipazy immobilizowanej z *Candida rugosa*, odzysku aktywności enzymu oraz stabilności katalitycznej.

Ten bardzo spójny materiał badawczy pozwolił Panu mgr Tomaszowi Siódmiałkowi na wyciągnięcie trafnych **wniośków**.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada trzy płaszczyzny pozwalające ją analizować jako nowatorską: (i) zastosowany warsztat analityczny, (ii) podjęcie zagadnień stereochemii leków z użyciem metod biokatalitycznych oraz (iii) przeprowadzenie immobilizacji enzymów na nanocząstkach magnetycznych. Badania Doktoranta posiadają niewątpliwe aspekty naukowe, jak i potencjał aplikacyjny. Dotyczy on w mojej ocenie szczególnie (i) wykonanych badań aktywności lipaz w formie wolnej i immobilizowanej na magnetycznych nanocząstkach, (ii) ustalenia metod syntezy i analizy magnetycznych nanocząstek tlenku żelaza z immobilizowanymi lipazami oraz (iii) wyznaczenia parametrów stereochemicznych pozwalających ocenić efektywność rozdziału kinetycznego. Chciałbym przy okazji zwrócić uwagę, że prace Doktoranta w zakresie immobilizacji enzymów na nanocząstkach opartych na tlenku żelaza (super paramagnetic iron oxide, SPIO), posiadają wartość rozważenia kolejne cele badawcze. Sugerowałbym przyjrzenie się tematyce zastosowań nośników SPIO w nowotworowo-specyficznym obrazowaniu z użyciem rezonansu magnetycznego.

Pan mgr Tomasz Siódmiałk uzyskał tytuł magistra farmacji w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Od 2010 r. jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków. Posiada w mojej ocenie znakomity dorobek naukowy, jest współautorem 7 publikacji o łącznym współczynniku

Impact Factor 13,39, wykonawcą i kierownikiem grantów badawczych. Był uczestnikiem 11 naukowych sympozjów krajowych i międzynarodowych, kursów, szkoleń dotyczących komercjalizacji badań naukowych i nawiązywania kontaktów z otoczeniem gospodarczym. Co jest istotne dla Jego szybkiej kariery, odbył staże naukowe na Wolnym Uniwersytecie w Brukseli oraz Uniwersytecie Islandzkim u uznanych ekspertów Pana Profesora Yvana Vander Heydena, Pani Profesor Debby Mangelings i Pana Profesora Gudmundura Haraldssona, co doskonale rokuje jego dalszej i szybkiej karierze naukowej. Pan mgr Tomasz Siódmiak swój udział w składających się na cykl publikacji ocenił na 50%, co znalazło też odzwierciedlenie w dopełniających udziałach procentowych Jego współautorów.

Reasumując uważam, że Pan mgr Tomasz Siódmiak doskonale zmierzył się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja bardzo wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia wiedzy przez Doktoranta z zakresu chemii leków, chemii analitycznej, biotechnologii i nanotechnologii. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wszystkie wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 - O stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. RP nr 65, poz. 595 z 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami (Dz.U. RP nr 164, poz. 1365 z 2005 r. oraz Dz.U. RP nr 204, poz. 1200 z 2011 r.), dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr farm. Tomasza Siódmiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, potwierdzoną wysokim sumarycznym współczynnikiem oddziaływania IF równym 10,89 wchodzących w jej zakres prac wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


dr hab. n. farm. Tomasz Gośliński