



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30  
fax: 61 854-66-39  
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 5 maja 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Rozdział kinetyczny racemicznych form leków beta-adrenolitycznych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów**

Imię i nazwisko: **mgr farm. Adam Edward Sikora**

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

Promotor: **prof. dr hab. Michał Marszałł**

Tematyka badawcza, dotycząca szeroko rozumianej chemii leków z uwzględnieniem zaawansowanych metod analitycznych, podjęta przez Pana mgr. Adama Sikorę jest rozwijana od kilku lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pana prof. dr hab. Michała Marszałła. Doktorant podjął się wykorzystania metod biokatalitycznych, dokładnie działania lipaz z *Candida rugosa* do rozdziału kinetycznego racemicznej formy leku beta-adrenolitycznego R,S-atenololu, ciekawie łącząc temat enancjoselektywnej biotransformacji z osiągnięciami nanotechnologii związanymi z magnetycznymi nanocząstkami.

Problem czystości analitycznej substancji leczniczej jest uwzględniany w regulacjach instytucji rządowych, porządkowany wytycznymi i przepisami zatwierdzonymi przez Stany Zjednoczone, Japonię i Unię Europejską. Sformułowane w temacie pracy zagadnienie badawcze jest niezwykle ważne, gdyż dotyka w szerszym wymiarze bardzo istotnego dla chemii farmaceutycznej problemu jakim jest czystość enancjomeryczna. W ostatnich 10 latach obserwuje się znaczny spadek rejestracji leków w formie racemicznej, przy wzroście udziału leków zawierających czyste enancjomery substancji leczniczych. Zagadnienie badawcze skupione wokół pozyskiwania stereochemicznie czystych substancji leczniczych dla celów farmaceutycznych jest bardzo istotne, gdyż związki optycznie czynne różnią się między sobą nie tylko pod względem farmakodynamicznym, ale i farmakokinetycznym, co przekłada się na skuteczność działania i profile działań niepożądanych. Badania naukowe wyposażyły nas w różne metody pozyskiwania enancjomerycznie czystych substancji aktywnych farmaceutycznie, a więc posiadających pożądaną jakość i efektywność działania oraz bezpieczeństwo stosowania. W syntezie substancji leczniczych wykorzystywane są powszechnie homochiralne związki naturalne, synteza asymetryczna, rozdział kinetyczny mieszanin racemicznych,

a także coraz częściej biotechnologiczne metody otrzymywania chiralnie czystych substancji aktywnych farmaceutycznie, wykorzystując do tego enancjoselektywne biokatalizatory. Rozdział kinetyczny opiera się na chiralnych kompleksach Jacobsena wykorzystywanych w syntezie stereoselektywnej, a także metodach biokatalitycznego wydzielania 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. Dzięki technikom immobilizacji izolowanych z grzybów i bakterii lipaz, enzymy te są dostępne także w formie oczyszczonych produktów białkowych oraz w postaci immobilizowanej, co pozwala na ich wielokrotne wykorzystanie. Dokonany przez Doktoranta wybór leków do badań, którymi są  $\beta$ -adrenolityki jest bardzo uzasadniony, gdyż w świetle literatury tylko S-enancjomery tej grupy wykazują działanie terapeutyczne, natomiast R-enancjomery są pozbawione działania, a nawet są odpowiedzialne za działania niepożądane. Od czasu wprowadzenia tych związków do leczenia 55 lat temu, za sprawą prac fizjologa i farmakologa, odkrywcy propranololu Jamesa Blacka, za co otrzymał w 1988 roku Nagrodę Nobla, niewiele się zmieniło. Leki te są stosowane w postaci racematów, choć są grupą, która odniosła jeden z największych sukcesów w farmakologii XX wieku.

Rozprawa doktorska Pana mgr. farm. Adama Sikory stanowi bardzo spójny tematycznie zbiór czterech publikacji opatrzonej obszernym komentarzem. Praca zawiera wszystkie wymagane rozdziały tj. wstęp, część teoretyczną, cel pracy, przedruki publikacji wraz z dyskusją najważniejszych osiągnięć w nich zawartych, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, informację o finansowaniu, wykaz rycin, oświadczenia autorów o ich udziale w publikacjach. Doktorant załączył ponadto (i) Curriculum Vitae oraz (ii) Wykaz wszystkich publikacji. Kolejność rozdziałów w rozprawie, cytowane piśmiennictwo i streszczenie nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera szereg rycin, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Nie mam także zastrzeżeń co do doboru i wykorzystania źródeł zarówno w publikacjach, jak i przygotowanym do nich komentarzu. Piśmiennictwo komentarza liczy 64 odnośniki literaturowe, odpowiednio dobrane i pochodzące w większości z ostatnich 10 lat. Komentarz został napisany poprawnym językiem naukowym. Jedyna drobna kwestia, zaznaczam, że różnie przedstawiana w kręgach naukowych, dotyczy użycia w pracy słowa syntetyzować, które jest postrzegane jako galizm (fr. synthétiser), stąd zaleca się użycia formy syntezować.

Treść rozprawy doktorskiej Pana mgr Adama Sikory, 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) rozdział kinetyczny, (ii) lipazy z *C. rugosa*

jako biokatalizatory rozdziału kinetycznego R,S-atenololu, (iii) superparamagnetyczne nanocząstki jako nośniki do immobilizacji lipaz, które stanowią zwarte oraz bardzo kompletne kompendium. Sprawia ono, że podjęte w dalszych częściach pracy zagadnienia, zdefiniowany cel, komentarz do publikacji wraz z pracami oraz wnioski wydają się naturalnie wpisywać w poruszane problemy. Zaplanowane przez Doktoranta w **celu** pracy badania miały dotyczyć opracowania i optymalizacji metody chromatograficznej z użyciem chiralnych faz stacjonarnych oraz zestawu UPLC-MS/MS do oznaczania substratów i produktów enancjoselektywnej biotransformacji wraz z optymalizacją rozdziału kinetycznego R,S-atenololu z zastosowaniem lipaz z *C. rugosa* w formie wolnej i immobilizowanej. Cel ten miał ponadto zostać wzbogacony o analizę literatury naukowej dotyczącej rozdziału kinetycznego leków  $\beta$ -adrenolitycznych.

Sposób wykonania badań przedstawiony w publikacjach wskazuje na biegłość Doktoranta w stosowanej metodologii i dokumentowaniu wyników. Udział mgr. Adama Sikory w przeprowadzonych w ramach cyklu publikacji badaniach, koresponduje z dopełniającymi opisami dotyczącymi udziałów współautorów prac. Doktorant krytycznie przedyskutował uzyskane dane eksperymentalne w publikacjach. Szczegółowe **badania i ich wyniki** znajdujące się w poddanych ocenie pracach dotyczą:

(i) **Publikacja 1** – Curr. Org. Chem. 14 (2017) 747-754 – Doktorant dokonał trafnego wyboru metod analitycznych, a następnie przeprowadził ich walidację. Dla potrzeb analiz dokonał oceny dziewięciu komercyjnie dostępnych enzymów, sześciu rozpuszczalników organicznych pełniących rolę środowiska reakcji, co pozwoliło na wyselekcjonowanie najbardziej optymalnego systemu katalitycznego. W ramach badań zoptymalizował rozdział chromatograficzny z użyciem chiralnego podłoża, co pozwoliło na jednoczesne oznaczenie enancjomerów substratów oraz produktów przeprowadzonej enancjoselektywnej biotransformacji. Na drodze rozdziału kinetycznego otrzymał enancjomerycznie czysty octan S-atenololu. Zaletą przeprowadzonych badań jest potwierdzenie możliwości zastosowania komercyjnie dostępnych lipaz oraz wykazanie ich różnej efektywności przy rozdziale kinetycznym R,S-atenololu. Doktorant wykazał, że wydajność kompletnego systemu katalitycznego zależy od kilku czynników, włączając w to lipazę, stężenie i charakter chemiczny donora grupy acetylowej, środowisko reakcji i czas reakcji, a octan izopropenylu okazał się najlepszym donorem grupy acetylowej. Z kolei toluen jako rozpuszczalnik, okazał się najlepszym środowiskiem do prowadzenia reakcji. Przeprowadzone badania jednoznacznie pozwoliły na wyselekcjonowanie lipaz z grupy *C. rugosa* (lipaza *C. rugosa* OF) o najwyższej aktywności katalitycznej i enancjoselektywności dla badanej biotransformacji;

(ii) **Publikacja 2** – J. Mol. Catal. B: Enzym. 134 (2016) 43-50 – Doktorant skupił się na enancjoselektywnej acetylacji RS-atenololu z użyciem lipaz z *C. rugosa* immobilizowanych na

chitozanowych magnetycznych nanocząstkach w biotransformacji katalizowanej enzymatycznie. Pomysł na immobilizację enzymu jest dobrym rozwiązaniem, szczególnie gdy chodzi o zwiększenie aktywności katalitycznej i stabilizację jego struktury. Otrzymane na drodze współwytrącania magnetyczne nanocząstki  $Fe_3O_4$  opłaszczane modyfikowanym chitozanem i funkcjonalizowane dwoma różnymi grupami aminoalkilowymi zostały poddane jako nośniki reakcjom z odpowiednio aktywowanym enzymem – lipazą (dwie izoformy *C. rugosa* OF i MY). Tego typu immobilizat odzyskiwano po przeprowadzaniu procesu biokatalitycznego z użyciem zewnętrznego pola magnetycznego. Badania wykazały stabilność immobilizowanego enzymu, a sam rozdział kinetyczny R,S-atenololu skutkował dobrą enancjoselektywnością reakcji. Najlepsze wyniki uzyskano dla izoformy *C. rugosa* OF;

(iii) **Publikacja 3** – Tetrahedron - Assymetry 28 (2017) 374-380 – W pracy podjęto temat enancjoseparacji R,S-atenololu z użyciem lipaz *C. rugosa* (MY i OF) immobilizowanych na nowo syntezowanych magnetycznych nanocząstkach charakteryzujących się różną liczebnością grup aminowych oddalonych każdorazowo od rdzenia linkerem etylenowym. Potwierdzono wysoką aktywność katalityczną i enancjoselektywność tego systemu, uzyskując octan S-atenololu o wysokiej czystości enancjomerycznej przy wysokiej konwersji reakcji. Sam zaś system katalityczny został przetestowany w kolejnych cyklach katalitycznych, wykazując wysokie parametry nawet po 5 cyklach i 1200 godzinach;

(iv) **Publikacja 4** – Mini-Rev. Org. Chem. 15 (2018) 374-381 – Doktorant dokonał przeglądu literatury na temat lipaz w ujęciu zastosowań biokatalitycznych w kinetycznym rozdziale racematów. W przeglądzie Doktorant omówił także właściwości samych nośników i różne techniki wiązania enzymu na nośniku. Z treści przygotowanego przeglądu wynika, że immobilizacja lipaz do matrycy skutkuje uzyskaniem biokatalizatorów o wysokiej stabilności operacyjnej i aktywności katalitycznej.

Zastanawiam się jakie przesłanki skłoniły Doktoranta do zaproponowania struktury N-acetylowanej, a nie O-acetylowanej, produktu - octanu S-atenololu, powstającego w biokatalitycznej reakcji estryfikacji (R,S)-atenololu. Czy były to wnioski wynikające z analizy referencji 10 w kontekście 5, 16 z Publikacji 1, czy też wykonano jakieś dodatkowe badania potwierdzające budowę chemiczną produktu reakcji biokatalitycznej?

Bardzo spójny materiał badawczy pozwolił mgr. Adamowi Sikorze na wyciągnięcie trafnych **wniosków**. Doktorant z sukcesem zoptymalizował i pomyślnie przeprowadził rozdział kinetyczny R,S-atenololu z użyciem lipaz *C. rugosa* zarówno w formie natywnej, jak i immobilizowanej na powierzchni nanocząstek magnetycznych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada trzy płaszczyzny pozwalające ją analizować jako nowatorską: (i) zastosowany nowoczesny warsztat badawczy i analityczny pozwalający na przeprowadzenie rozdziału kinetycznego racematu

R,S-atenololu z wykorzystaniem lipaz z *Candida rugosa* na drodze enancjoselektywnej transestryfikacji, (ii) podjęcie zagadnień stereochemii leków z użyciem metod biokatalitycznych stosując zarówno formy natywne enzymów, jak i enzymy związane z magnetycznym nośnikiem oraz (iii) duży potencjał aplikacyjny przedstawionych rozwiązań zarówno dla nauk podstawowych, jak i przemysłu.

Pan mgr Adam Sikora uzyskał tytuł magistra farmacji w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w 2014 r. Od 2015 r. jest zatrudniony w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków na stanowisku asystenta, wcześniej technika. Jest lub był uczestnikiem 6 kursów, szkoleń dotyczących specjalizacji z analityki farmaceutycznej, różnych aspektów nowoczesnych technik analitycznych, modelowania farmakokinetyczno-farmakodynamicznego, technik obliczeniowych oraz analizy produktów leczniczych. Odbył staże naukowe na Vrije Universiteit Brussel. Bierze udział w pracach badawczych jako wykonawca i kierownik projektów badawczych z NCN, a także współpracuje z przemysłem. Ponadto został za swoją działalność wielokrotnie wyróżniony i odznaczony, m.in. w 2018 r. został stypendystą MNiSW za wybitne osiągnięcia dla doktorantów. Posiada w mojej ocenie znakomity dorobek naukowy, jest współautorem 16 publikacji o łącznym współczynniku Impact Factor 38,847 i punktacji MNiSW 437, współautorem 38 wystąpień konferencyjnych.

**Reasumując uważam, że Pan mgr Adam Sikora doskonale zmierzył się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazał się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja bardzo wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktoranta wiedzy z zakresu chemii leków, chemii analitycznej i nanotechnologii. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia 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, w tym Ustawą z dnia 28 kwietnia 2017 r. – O zmianie ustawy o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz.U. RP poz. 859 z 2017 r., dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego o dopuszczenie mgr. farm. Adama Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się także z wnioskiem o wyróżnienie.



prof. dr hab. Tomasz Gośliński