



**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych**  
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2A  
tel. 85 748 57 43

Białystok, 21.11.2023

Ocena rozprawy doktorskiej pt.:

**Enancjoselektywna biotransformacja wybranych substancji czynnych  
z zastosowaniem cieczy jonowych**

wykonanej przez

**mgr farm. Joannę Chałupkę**

pod kierunkiem:

prof. dr hab. n. farm. Michała Piotra Marszałła

*Podstawa formalna wykonania recenzji: Uchwała nr 100/2023 Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 19.09.2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Joanny Chałupki w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.*

**Ocena strony formalnej**

Praca doktorska Pani mgr Joanny Chałupki stanowi zestawienie czterech zgodnych tematycznie opublikowanych anglojęzycznych prac: jednej pogłądowej i trzech oryginalnych, które pomyślnie przeszły ocenę międzynarodowych recenzentów. W pracy zamieszczono oświadczenia współautorów publikacji podkreślających kluczową rolę Doktorantki w opracowaniu koncepcji badań i hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu oznaczeń, opracowaniu danych, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptów, wprowadzeniu poprawek i wykonaniu czynności związanych z procesem publikowania.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma typowy układ rozprawy doktorskiej powstałej na bazie spójnego tematycznie zbioru prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską są następujące:



1. **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, A. Kozicka, Michał Piotr Marszałł. Overview: enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry*, 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791. DOI: 10.2174/1385272824999201020204256.  
IF = 2,180; MEiN = 70
2. **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts*, 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068.  
IF = 4,501; MEiN = 100
3. **Joanna Chałupka**, Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Marszałł. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.  
IF = 4,501; MEiN = 100
4. **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska, Michał Piotr Marszałł. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13), 11124. DOI: 10.3390/ijms241311124.  
IF = 6,208; MEiN = 140

Przytoczony cykl publikacji dotyczy bardzo ważnego z punktu widzenia nauk farmaceutycznych aspektu rozdziału związków aktywnych biologicznie na pojedyncze racematy. Prace opublikowano w czasopiśmie o istotnym wskaźniku wpływu (łączna liczba punktów obliczona wg daty opublikowania prac wynosi 410 pkt. MEiN, a sumaryczny IF=17,39). Na podkreślenie zasługuje samodzielność badawcza Pani mgr Joanny Chałupki (pierwsza autorka we wszystkich czterech pracach). Dowodzi to dużej kreatywności i znajomości najbardziej pożądaných kierunków badawczych. Swobodne posługiwanie się fachowym językiem angielskim, przygotowanie wyników zamieszczonych w publikacjach w formie wykresów i tabel obrazujących uzyskane wyniki jest bardzo staranne i czytelne.



Wprawdzie struktura i układ pracy są prawidłowe to w spisie treści został pominięty rozdział 14- spis tabel.

Reasumując uważam, że przedstawiona rozprawa od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń.

### **Ocena strony merytorycznej**

Większość stosowanych produktów leczniczych w medycynie posiada strukturę chiralną. Niestety różnice występujące we właściwościach biologicznych izomerów powodują poważne problemy w racjonalnej farmakoterapii. Z tego względu zespoły badawcze coraz częściej podejmują starania, aby produkt końcowy syntezy leków stanowiły substancje czynne w postaci enancjomerów zamiast wcześniej stosowanych mieszanin racemicznych. Wykorzystanie stereospecyficznych preparatów niesie ze sobą wiele korzyści. Można w ten sposób zmniejszyć wielkość efektywnej dawki niezbędnej do osiągnięcia działania terapeutycznego, zmniejszając tym samym ryzyko pojawienia się działań niepożądanych i interakcji z innymi lekami. Pozwala to także na zwiększenie skuteczności terapeutycznej pojedynczej dawki leku, a także uniknięcie licznych niekorzystnych interakcji w politerapii. Ponadto umożliwia zmniejszenie toksyczności spowodowanej obecnością nieaktywnych stereoizomerów. Jednakże w wyniku syntezy chemicznej, która wciąż jest jedną z podstawowych metod otrzymywania nowych leków i prekursorów bardzo trudno jest otrzymać związek biologicznie czynny w postaci konkretnego enancjomeru. Dlatego też wciąż podejmowane są próby poszukiwania innowacyjnych metod pozwalających na otrzymanie stereospecyficznych czystych substancji aktywnych. Mając na uwadze ilość nowej wiedzy, którą dostarcza aktualnie nauka i nasuwając wciąż kolejne pytania badawcze przedstawiona do recenzji praca jest próbą odpowiedzi na te wyzwania. Dlatego wybór tematu pracy dysercyjnej Pani mgr Joanny Chałupki uważam w pełni za uzasadniony.

Tytuł pracy odnoszący się do cyklu publikacji odpowiada celowi i treści rozprawy. Dobór tematu badawczego świadczy o zorientowaniu Doktorantki na ważne problemy chemii medycznej i o dużej kreatywności w projektowaniu badań. Zaprojektowane założenia pracy Pani mgr Joanny Chałupki są bardzo interesujące i pozwalają na wiele oryginalnych



spostrzeżeń, ważnych nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale posiadających istotne wartości aplikacyjne. Mając na uwadze znaczenie powyższych czynników uważam, że praca dostarcza nowej wiedzy w zakresie tego tematu badawczego, co pozwala Recenzentowi na stwierdzenie, że Autorka orientuje się w aktualnych trendach badań i wykorzystuje najnowsze osiągnięcia nauki w celu ich modyfikacji. Z tego względu bardzo wysoko oceniam wartość naukową i aplikacyjną ocenianej rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona hipoteza badawcza została sformułowana w sposób prawidłowy i zakłada optymalizację warunków reakcji rozdziału kinetycznego wybranych substancji czynnych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów w dwufazowym układzie katalitycznym składającym się z rozpuszczalnika organicznego oraz cieczy jonowej. Do zrealizowania głównej hipotezy wyznaczono cztery jasno sformułowane cele badawcze, które łączą się w logiczną całość i odnoszą się do sposobu opracowania wyników, jednocześnie informując czego można spodziewać się w kolejnych publikacjach. Są to:

1. Analiza literatury naukowej dotyczącej rozdziałów kinetycznych produktów leczniczych stosowanych w kardiologii na przykładzie leków  $\beta$ -adrenolitycznych.
2. Optymalizacja procesu rozdziału chromatograficznego (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych chiralnych faz stacjonarnych oraz systemów HPLC i UPLC-MS/MS;
3. Optymalizacja rozdziałów kinetycznych (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu na drodze enancjoselektywnej biotransformacji z zastosowaniem dwufazowych układów katalitycznych zawierających cieczy jonowe.
4. Testowanie i ocenę aktywności wykorzystanych lipaz w kolejnych cyklach reakcyjnych enancjoselektywnej biotransformacji (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu.

W pierwszym poglądowym manuskrypcie, z 4 jednotematycznych publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, w formie systematycznego przeglądu wykazano potrzebę opracowania i optymalizacji nowej metody enzymatycznego rozdziału kinetycznego leków  $\beta$ -adrenolitycznych. Przeprowadzony przegląd literaturowy pozwolił na zaobserwowanie korzyści wynikającej ze stosowania cieczy jonowych w rozdziałach



kinetycznych leków  $\beta$ -adrenolitycznych. Stanowiło to podstawę do dalszych badań, które zostały zaprezentowane w kolejnych pracach. Podjęto w nich próbę zoptymalizowania rozdziału kinetycznego z wykorzystaniem dwufazowych układów katalitycznych zawierających cieczy jonowe (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyloetanolu i kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu. W przypadku (*R,S*)-atenololu testowano wpływ cieczy jonowych oraz dwóch izoform lipazy z *Candida rugosa* (OF lub MY) na rozdział kinetyczny tego leku z zastosowaniem octanu winylu pełniącego funkcję donora grupy acetylowej. Wynikiem przeprowadzonych badań jest zaproponowanie mieszaniny reakcyjnej pozwalającą na uzyskanie chiralnie czystego octanu (*S*)-atenololu. Następnie wykonano badania dotyczące zastosowania dwufazowego układu reakcyjnego w rozdziale kinetycznym (*R,S*)-1-fenyloetanolu. W efekcie zaproponowano optymalne warunki enancjoselektywnej esteryfikacji umożliwiającej uzyskanie chiralnie czystego (*S*)-1-fenyloetanolu. Dodatkowo w ramach zrealizowanych prac badawczych zoptymalizowano enancjoselektywną biotransformację oraz określono wpływ czynnika acetylującego środowiska reakcji oraz zastosowanego biokatalizatora na efektywność i enancjoselektywność prowadzonych rozdziałów kinetycznych. Ostatnim etapem prac badawczych była optymalizacja rozdziału kinetycznego kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu. Polegały one na badaniu wpływu środowisk reakcji, które różniły się między sobą rozpuszczalnikiem organicznym oraz cieczą jonową, na enancjoselektywność oraz wydajność prowadzonych biotransformacji. W ich wyniku zaproponowano optymalne warunki enancjoselektywnej estryfikacji pozwalającej na uzyskanie chiralnie czystego (*S*)-klopidogrelu.

Mając na uwadze, iż praca doktorska jest zbiorem tematycznie spójnych prac badawczych, cel, materiał, metody i wyniki są omówione dla każdej z czterech publikacji. Dobór metod badawczych nie budzi zastrzeżeń. Niewątpliwą zaletą pracy jest duża liczba przeprowadzonych analiz z zastosowaniem różnych systemów katalitycznych. Do interpretacji uzyskanych wyników zastosowano odpowiednie prawidłowo dobrane zaawansowane procedury statystyczne umożliwiające wielowymiarowe możliwości interpretacyjne wyników. Uzyskane wyniki Doktorantka prawidłowo zanalizowała, zinterpretowała i przedyskutowała. Omówienie uzyskanych wyników napisane jest z dużą



wnikliwością i znajomością problemu oraz bardzo dobrze skonfrontowane z licznymi wynikami innych autorów co oceniam bardzo wysoko. Wszystkie prace stanowią logicznie powiązaną całość. Należy podkreślić, że Autorka wykazała się wszechstronną znajomością stanu wiedzy w zakresie rozwiązywanego problemu. Mam duże przekonanie, że takie podejście do pracy naukowej pozwoli jej w przyszłej pracy badawczej projektować i prowadzić badania o ważnym znaczeniu naukowym jak i aplikacyjnym. Należy także zaznaczyć, że w każdej opublikowanej pracy oryginalnej dobór piśmiennictwa był prawidłowy i zawierał najbardziej znaczące zagraniczne prace badawcze z ostatnich lat o wysokim indeksie wpływu. Przygotowaną przez Panią mgr Joannę Chałupkę rozprawę doktorską kończą wnioski, które dotyczą najważniejszych stwierdzeń końcowych i są odpowiedzią na postawioną hipotezę badawczą. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale są nośnikiem treści, które mogą być przydatne dla farmaceutów, chemików oraz biotechnologów i mogą być inspiracją do dalszych innowacyjnych badań.

Obowiązkiem recenzenta jest nie tylko merytoryczna ocena przedstawionej rozprawy doktorskiej, ale także zwrócenie uwagi na redakcję pracy. Wprawdzie recenzent dostrzegł nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne, to jednak należy podkreślić, że praca jest napisana, ładnym i zrozumiałym językiem, a szata graficzna, redakcja oraz estetyka pracy nie budzą zastrzeżeń.

Moja ocena pracy jest bardzo wysoka, chciałbym jednak uzyskać odpowiedź na kilka nurtujących mnie pytań:

1. W każdej z trzech prac eksperymentalnych została zastosowana lipaza z *Candida rugosa*. Czy w trakcie tworzenia hipotezy były brane pod uwagę inne lipazy? Jeżeli tak to jakie i dlaczego nie zostały włączone do pracy doktorskiej? Jeżeli nie, to dlaczego wybór padł właśnie na tą lipazę?
2. Jakimi przesłankami kierowała się Doktorantka przy wyborze zastosowanych cieczy jonowych?
3. Czy Autorka ma już wizję następnego projektu? Jeśli tak, to proszę o odpowiedź jakie dodatkowe czynniki zostałyby uwzględnione w badaniu?



**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych**  
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2A  
tel. 85 748 57 43

## **Wniosek końcowy**

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana rzetelnie, szczegółowo i zgodnie z obowiązującymi zasadami redagowania tego typu publikacji. Praca została starannie zredagowana i napisana poprawnym językiem, z wykorzystaniem właściwej terminologii naukowej. Dodatkowo reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Jej realizacja wymagała od Autorki pełnego zaangażowania, dużej wiedzy merytorycznej oraz dobrej organizacji całości badań.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca w całości spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1798 ze zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o nadanie Pani mgr Joannie Chałupce stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

dr hab. Robert Czarnomysy