



Poznań, dnia 10 grudnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Enancjoselektywna biotransformacja wybranych substancji czynnych z zastosowaniem cieczy jonowych.**

Imię i nazwisko: **mgr Joanna Chałupka**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu**

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

Temat pracy, dotyczący enancjoselektywnej biotransformacji wybranych substancji czynnych z zastosowaniem cieczy jonowych, podjęty przez Panią mgr Joannę Chałupkę jest rozwijany od kilkunastu lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków pod kierunkiem Promotora niniejszej pracy, Pana prof. dr hab. Michała Marszałła. Tematyka badawcza włącza się w nurt badań podstawowych oraz aplikacyjnych dotyczących czystości analitycznej substancji leczniczych i pod względem ważności tematyki dla nauk farmaceutycznych może jedynie konkurować z technologią postaci leku. Problem czystości enancjomerycznej jest od około 30 lat uwzględniany w regulacjach instytucji rządowych, porządkowany wytycznymi REACH i przepisami w zakresie ochrony środowiska zatwierdzonymi przez Unię Europejską, Stany Zjednoczone i Japonię. Działania te doprowadziły do znacznego spadku rejestracji i sprzedaży leków w formie racemicznej na korzyść leków zawierających czyste enancjomery substancji leczniczych, które charakteryzują się większą efektywnością działania, mniejszą ilością działań niepożądanych, a tym samym większym bezpieczeństwem. Z tego względu tematyka podjęta przez Doktorantkę jest bardzo aktualna, a dokonany wybór tematu uważam za bardzo uzasadniony.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Joanny Chałupki stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji opatrzonych stosownym komentarzem. Doktorantka zawarła w dysertacji: (i) informację o finansowaniu i publikacjach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, (ii) słowa kluczowe i wykaz stosowanych skrótów w języku polskim i angielskim, (iii) wstęp, (iv) wprowadzenie do zagadnień szczegółowych poruszanych w pracy, (v) cel pracy, (vi) wyniki i dyskusję, (vii) wnioski, (viii) streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, (ix) literaturę, (x) spis rycin, (xi) oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach, (xii) zaświadczenia o udziale w grantach oraz (xiii) informację o dorobku naukowym. Poszczególne rozdziały zostały napisane poprawnym językiem naukowym, a kolejność przedstawiania danych i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Piśmiennictwo komentarza liczy 113 odnośników literaturowych, które zostały odpowiednio dobrane i pochodzą w większości z ostatnich 20 lat. W pracy zamieszczono 35 rycin i 9 tabel. Z informacji zamieszczonej na początku pracy dowiadujemy się, że badania zawarte w rozprawie były współfinansowane ze środków grantu NCN Preludium 14. Następnie mgr Joanna

Chałupka przedstawiła dane bibliometryczne dotyczące czterech publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, w których jednocześnie jest pierwszym autorem: (i) *Current Organic Chemistry* z 2020 r., (ii) *Catalysts* z 2022 r., (iii) *Catalysts* z 2023 r. oraz (iv) *International Journal of Molecular Sciences* z 2023 r. Łączny wskaźnik oddziaływania Impact Factor publikacji włączonych do dysertacji wynosi 17,39, a punktacja MEiN 410. Z zawartych w oświadczeniach informacji jasno wynika, że Doktorantka w stopniu znaczącym przyczyniła się do powstania wszystkich publikacji, gdyż brała udział w opracowaniu koncepcji badań i hipotezy badawczej, zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań, opracowaniu danych, przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptów i ich korekcie.

W dalszej części rozprawy, po wymienieniu słów kluczowych oraz wyjaśnieniu stosowanych skrótów, Doktorantka zawarła rzeczowo napisany **Wstęp**, dotyczący czystości enancjomerycznej leku. Zwróciła uwagę, że wciąż w produktach leczniczych stosowane są racematy, a nie czyste enancjomery, co nie zawsze, ale w wielu przypadkach może skutkować pojawianiem się działań niepożądanych, a także koniecznością przyjmowania większych dawek leku. Dalej przedstawiła enzymatyczny rozdział racemiczny jako metodę otrzymywania czystego enancjomeru. Wskazała stereoselektywną biotransformację racematu w obecności lipazy jako metodę pozyskiwania wybranych enancjomerów przy uwzględnieniu odpowiedniego środowiska jako czynnika wpływającego na efektywność i enancjoselektywność procesu. Z uwagi na ograniczenia związane z rozpuszczalnością racematów w rozpuszczalnikach organicznych, Doktorantka zaproponowała zastosowanie w rozdziałach kinetycznych układów dwufazowych opartych na cieczach jonowych w połączeniu z rozpuszczalnikami organicznymi, przedstawiając szeroko zalety takiego rozwiązania. W samej pracy postanowiła skupić się na ocenie wpływu cieczy jonowych na enancjoselektywne biotransformacje różnych racemicznych mieszanin substancji stosowanych w lecznictwie, w tym (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenylotanolu i kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu. Zaproponowała badania aktywności katalitycznej lipaz w biotransformacjach wraz z porównaniem parametrów kinetycznych, takich jak enancjoselektywność, konwersja, nadmiar enancjomeryczny substratów i produktów. Warto podkreślić, że zaproponowane zagadnienia badawcze są w pełni interdyscyplinarne, łącząc najnowsze trendy chemii medycznej, analizy farmaceutycznej i biotechnologii. W szerszym wymiarze badania prowadzące do czystych enancjomerycznie substancji przyczyniają się do redukcji działań niepożądanych i poprawy bezpieczeństwa stosowania leków. Należy podkreślić, że przewodząca dysertacji hipoteza badawcza i pomysł na wypełnienie powiązanej z nią luki badawczej jest bardzo zaawansowany, bo dotyczy istotnych zagadnień podstawowych, ale także może w przyszłości przełożyć się na wymierne efekty praktyczne. W kolejnych rozdziałach zatytułowanych: Izomeria, Chiralność substancji czynnych, Enzymatyczny rozdział kinetyczny jako metoda otrzymywania chiralnych czystych związków, Pani mgr Joanna Chałupka skupiła się na przedstawianiu zagadnień skupionych wokół hipotezy badawczej. Wyczerpująco uzasadniła znaczenie środowiska prowadzenia reakcji w procesie rozdziału kinetycznego, zwracając uwagę na zasadność doboru odpowiedniego rozpuszczalnika. Zagadnienia te doskonale wpisują się w poruszane w publikacjach tematy i ułatwiają ich zrozumienie. Stanowią też bardzo dobre kompendium o walorach dydaktycznych. W kolejnym rozdziale pod tytułem Enzymy, Doktorantka zawarła kilka zagadnień szczegółowych, jak ogólna charakterystyka enzymów – budowa i działanie, interakcje enzym

substrat z uwzględnieniem modeli Fischera i Koshlanda, klasyfikację i nomenklaturę enzymów, kinetykę reakcji enzymatycznych, z uwzględnieniem modelu Michaelisa-Menten, równania Lineweavera-Burka, inhibicję kompetycyjną i niekompetycyjną enzymów oraz praktyczne znaczenie inhibitorów, biokatalizę, charakterystykę lipaz z uwzględnieniem ich rodzajów, katalizowanych reakcji i zastosowań. W rozdziale pt. Ciecze jonowe przedstawiła ogólną ich charakterystykę, metody otrzymywania, podział i budowę oraz zastosowanie, w tym do rozdziału kinetycznego racematów. W ostatnim podrozdziale związanym z częścią literaturową skupiła się na parametrach opisujących enancjoselektywność reakcji, w tym na nadmiarze enancjomerycznym substratów i produktów, stopniu konwersji i enancjoselektywności.

W rozdziale **Cel pracy**, Pani mgr Joanna Chałupka zidentyfikowała lukę badawczą w istniejącym stanie wiedzy postanawiając w dysertacji skupić się na optymalizacji warunków reakcji rozdziału kinetycznego wybranych substancji czynnych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów w dwufazowym układzie katalitycznym złożonym z rozpuszczalnika organicznego i cieczy jonowej. W ramach celów szczegółowych postanowiła przeanalizować czynniki wpływające na rozdział kinetyczny, a następnie przeprowadzić analizy z użyciem ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas lub detektorem DAD. Przedmiotem prac badawczych miała być analiza wpływu czynników zastosowanych w reakcjach kinetycznych na wartość parametrów wskazujących na ich enancjoselektywność.

Szczegółowe rezultaty zostały zawarte w kolejnym rozdziale **Wyniki i dyskusja wyników** w formie komentarza do publikacji i ich kopii:

(i) **Publikacja 1** – *Current Organic Chemistry* 24 (2020) 2782 – W pracy przeglądowej Doktorantka poruszyła temat enzymatycznej enancjoselektywnej biotransformacji na przykładzie leków wykorzystywanych w terapii nadciśnienia. Dokonała analizy danych literaturowych w zakresie enzymatycznego rozdziału kinetycznego leków β -adrenolitycznych. Poruszony temat jest bardzo istotny, gdyż przez wiele lat podtrzymywane było przekonanie, że β -blokery można z powodzeniem wykorzystywać jako racematy z (*S*)-enancjomerem wykazującym pożądaną efekt terapeutyczny. Tymczasem wielokrotnie obserwowane dla racematów działania uboczne wskazały na konieczność wyeliminowania potencjalnie szkodliwego (*R*)-enancjomeru. Doktorantka dokonała selekcji piśmiennictwa i omówiła metody rozdziałów (*R,S*)-atenololu i (*R,S*)-propranololu. Zauważyła, że procedury rozdziału kinetycznego poza jednym przypadkiem, gdy zastosowano dwufazowy układ katalityczny oparty na cieczy jonowej i rozpuszczalniku organicznym, prowadzone były wyłącznie w rozpuszczalnikach organicznych. W pracy omówiła także zalety stosowania dwufazowego układu katalitycznego.

(ii) **Publikacja 2** – *Catalysts* 12 (2022) 1068 – Doktorantka podjęła się zastosowania dwufazowych układów katalitycznych w enancjoselektywnej biotransformacji racemicznego atenololu. Na początku pracy przedstawiła szeroki kontekst badań w zakresie poszukiwania leków do terapii nadciśnienia oraz uzasadnienie dla stosowania poświadczonych terapeutycznie (*S*)-enancjomerów β -blokerów. Następnie uzasadniła korzyści z prowadzenia stereoselektywnej biotransformacji z użyciem lipaz w układach dwufazowych opartych na cieczach jonowych i rozpuszczalnikach organicznych. W ramach badań zoptymalizowała rozdział kinetyczny (*R,S*)-atenololu z użyciem dwufazowego układu katalitycznego zawierającego ciecze jonowe oraz dwóch różnych izoform

Candida rugosa (OF lub MY), stosując octan winylu jako donor grupy acetylowej. Wspomnianą reakcję zbadała w 8 różnych układach katalitycznych, analizując z użyciem systemu UPLC-MS/MS zachodzące zmiany w zakresie nadmiarów enancjomerycznych substratów i produktów, konwersji i enancjoselektywności. Drobiazgowe badania i analiza wyników pozwoliły na wyselekcjonowanie układu katalitycznego opartego na 1-etylo-3-metyloimidazoliowym tetrafluoroboranie i toluenie jako tego, dla którego jest możliwe uzyskanie enancjomerycznie czystych pochodnych atenololu ($ee_p = 93,76\%$) przy najwyższej czystości katalitycznej i enancjoselektywności ($E = 57,22$) rozdziału kinetycznego. Warto dodać, że Doktorantka wykazała możliwość wielokrotnego wykorzystania lipaz w pięciu kolejnych cyklach katalitycznych.

(iii) **Publikacja 3** – *Catalysts* 13 (2023) 292 – Doktorantka podjęła się zastosowania dwufazowych układów katalitycznych do enancjoselektywnego rozdziału (*R,S*)-1-fenylloetanolu. Na początku pracy uzasadniła korzyści wynikające z zastosowania biokatalizy w zestawieniu z katalizą chemiczną w chemii i farmacji, omawiając zastosowanie lipaz. Jako związek modelowy do badań wybrała naturalnie występujący w przyrodzie 1-fenylloetanol. Zwróciła uwagę, że (*S*)-1-fenylloetanol jest często wykorzystywanym substratem przy otrzymywaniu wielu substancji aktywnych farmaceutycznie. W dalszej części obszernie scharakteryzowała ciecze jonowe, ich właściwości fizykochemiczne i możliwości wykorzystania w syntezie. W ramach badań dokonała optymalizacji rozdziału kinetycznego (*R,S*)-1-fenylloetanolu poddając go acetylacji octanem winylu lub octanem izoprenylu. W ramach enancjoselektywnej biotransformacji do (*S*)-1-fenylloetanolu przetestowała 40 układów katalitycznych różniących się czynnikiem acetylującym, środowiskiem reakcji, cieczą jonową (w 8 wariantach pominięto ciecz jonową) i biokatalizatorem (*Burkholdera cepacia*, *Candida rugosa* OF). Zmiany zachodzące w roztworach reakcyjnych były monitorowane w czasie 168 godzin w 24 godzinnych przedziałach czasowych z użyciem chiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej z detekcją UV-VIS, co pozwoliło na wykazanie dla zastosowanych układów różnych enancjoselektywności i nadmiarów enancjomerycznych substratów i produktów. Najbardziej wydajnym i enancjoselektywnym układem okazał się układ katalityczny zawierający lipazę *Burkholdera cepacia*, 1-etylo-3-metyloimidazoliowy tetrafluoroboran i *n*-heptan z wartościami $E = 379$ i $ee_p = 98,9\%$. Warto dodać, że oceniono możliwość wielokrotnego wykorzystania lipaz w pięciu kolejnych cyklach katalitycznych.

(iv) **Publikacja 4** – *International Journal of Molecular Sciences* 24 (2023) 11124 – Doktorantka podjęła się optymalizacji reakcji enancjoselektywnej estryfikacji (*R,S*)-klopidogrelu z zastosowaniem cieczy jonowych. Na początku pracy uzasadniła wybór leku do badań wskazując na jego zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu wybranym chorobom sercowo-naczyniowym poprzez zastosowanie terapii przeciwpłytkowej. Dalej omówiła klopidogrel z uwzględnieniem budowy, metabolizmu, wskazując na znaczenie stosowania enancjomerycznej formy terapeutycznej (*S*)-klopidogrelu oraz wykazując działania niepożądane i ograniczenia (*R*)-klopidogrelu. W ramach badań skupiła się na optymalizacji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu, celem uzyskania enancjomerycznie czystego (*S*)-klopidogrelu. Zweryfikowała wpływ środowiska reakcji oraz lipazy *Canida rugosa* na konwersję i enancjoselektywność w prowadzonych procesach rozdziałów kinetycznych analizując 18 różnych układów katalitycznych w czasie 120 godzin i stosując analizę UPLC-MS/MS. Najlepsze parametry $E = 113,40$ i $ee_p = 94,21\%$ uzyskała dla dwufazowego układu

katalitycznego opartego na cykloheksanie i 1-etylo-3-metyloimidazoliowym tetrafluoroboranie oraz lipazie z *Candida rugosa*.

W rozdziale **Wnioski** Doktorantka zebrała najważniejsze dokonania zawarte w cyklu opublikowanych prac oryginalnych, które zawarła w 12 wnioskach.

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Chałupki zawarta w cyklu trzech oryginalnych i jednej przeglądowej publikacji jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Sposób prowadzenia badań i interpretacji wyników w pracach oryginalnych wskazuje na biegłość Doktorantki w stosowanej metodologii i dokumentowaniu wyników. Uzyskane dane eksperymentalne zostały w przedstawionych do oceny pracach krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i bezpośrednich wieloletnich doświadczeń Zespołu. Uzyskane wyniki mają więc duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład do chemii farmaceutycznej. Praca została zrealizowana według dobrze przemyślanego schematu, co pozwoliło na zweryfikowanie hipotezy badawczej. Hipoteza badawcza wraz z powiązaniem z celem pracy, polegającym na optymalizacji warunków reakcji rozdziału kinetycznego wybranych substancji czynnych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów w dwufazowym układzie katalitycznym złożonym z rozpuszczalnika organicznego i cieczy jonowej, zostały osiągnięte i zrealizowane. Badania Doktorantki jasno wskazały na możliwość zastosowania proponowanego podejścia do otrzymania enancjomerów badanych substancji aktywnych farmaceutycznie. Doktorantka skrupulatnie prześledziła z użyciem chiralnej chromatografii cieczowej przebieg procesów zachodzących w mieszaninach reakcyjnych podczas rozdziału. Dla enancjomerycznie czystego (*R,S*)-atenololu i kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu zaproponowała lipazę z *Candida rugosa*, podczas gdy dla (*R,S*)-1-fenyletanolu lipazę z *Burkholderia cepacia*. Wykazała, że zastosowanie układów złożonych opartych na cieczy jonowej i rozpuszczalniku organicznym w rozdziałach kinetycznych wywiera wpływ na efektywność i enancjoselektywność prowadzonych biotransformacji, a co jest istotne pozwala także na możliwość ich wielokrotnego wykorzystania. Uzyskane wyniki dostarczyły perspektyw dla kolejnych badań podstawowych i aplikacyjnych o dużym znaczeniu dla nauk farmaceutycznych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada kilka płaszczyzn pozwalających ją analizować jako nowatorską: (i) podjęcie zagadnień bardzo aktualnych naukowo poprzez włączenie się w nurt badań enzymów jako enancjoselektywnych katalizatorów do pozyskiwania wysokiej czystości substancji aktywnych farmaceutycznie, który wpisuje się w zagadnienia tzw. zielonej chemii, (ii) zastosowany bardzo nowoczesny warsztat badawczy łączący techniki analityki i biotechnologii farmaceutycznej, (iii) duży potencjał poznawczy uzyskanych wyników, stanowiący wkład w problematykę bezpieczeństwa leków, tym samym porządkujący zastany stan wiedzy i otwierający nowe perspektywy dalszych ciekawych zastosowań aplikacyjnych. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawione i opublikowane dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną.

Pani mgr Joanna Chałupka posiada w mojej ocenie znakomity dorobek naukowy. Na dzień 28 sierpnia 2023 r. była współautorką 7 publikacji o łącznym współczynniku Impact Factor 27,463 i punktacji MEiN 750, liczba cytowań prac wg WoS wynosiła 38, a Indeks Hirscha 2. Wzięła udział w 8 konferencjach naukowych o charakterze krajowym i 2 międzynarodowych, prezentując postery i komunikaty ustne. Brała udział

w 4 projektach badawczych jako wykonawca, odbyła liczne szkolenia, a Jej praca została doceniona nagrodami o zasięgu uczelnianym. Uzyskane doświadczenie doskonale rokuje jej dalszej i szybkiej karierze naukowej.

Wszystkie rozdziały i prace eksperymentalne zawarte w dysertacji zostały napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. W czasie lektury pracy pojawiły się dwie kwestie o charakterze dyskusyjnym, o których rozwinięcie poproszę Doktorantkę podczas publicznej obrony: (i) Jakie są metody wydzielenia docelowych produktów reakcji – właściwych enancjomerów z cieczy jonowych?; (ii) str. 122 – Jakie badania były prowadzone lub można zaproponować celem poparcia wniosku, że ciecze jonowe wpływają na konformację lipaz poprzez oddziaływania jonowe, dipolarne, wiązania wodorowe lub van der Waalsa, co przekłada się na inhibicję lub hiperaktywację biokatalizatorów? Zwracam także uwagę na nieliczne kwestie edytorskie, które pojawiły się podczas czytania pracy: (i) str. 15, Rycina 4 – Zapewne chodziło o konfigurację, a nie konformację; (ii) str. 17, Rycina 5 – Czy na skali rzędnych powinno znaleźć się 10%?; (iii) str. 41, Tabela 5, poz. 9 – Zastosowano określenie wodorotlenek kwasu karboksylowego – Czy można użyć określenia peroksykwas lub nadkwas?; (iv) str. 45, Rycina 20 – Na rysunku pokazano kation 1-alkilopirydyniowy oraz kation 1-alkilo-1-metylopirolidyniowy (dalej w tekście na str. 47 zastosowano dla obu z nich poprawną nomenklaturę). Rycina 21 - W przypadku anionu NTf_2^- nie pokazano ładunku na rysunku.

Reasumując uważam, że Pani mgr Joanna Chałupka doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja bardzo wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu chemii i biotechnologii farmaceutycznej. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne o dopuszczenie mgr Joanny Chałupki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z osobnym wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


prof. dr hab. Tomasz Gośliński