

Gdańsk, 2024-02-10

## Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Joanny Chałupki pod tytułem „*Enancjoselektywna biotransformacja wybranych substancji czynnych z zastosowaniem cieczy jonowych*”

Ponad 50% produkowanych i wykorzystywanych w terapii leków to cząsteczki o charakterze chiralnym, zawierające co najmniej jedno centrum asymetrii w swojej strukturze. Ponieważ doskonale znane są potencjalne różnice we właściwościach farmakodynamicznych, farmakokinetycznych a w konsekwencji także toksykologicznych enancjomerów to od 1994 roku obowiązują w Unii Europejskiej wytyczne Europejskiej Agencji Leków (*European Medicine Agency, EMA*), określające kryteria rejestracji nowych, chiralnych substancji czynnych. Wytyczne te wyraźnie określają zasady prowadzące, w procesie otrzymywania nowych leków, do opracowywania enancjomerycznie czystego produktu leczniczego, czyli w praktyce pojedynczego enancjomeru. W efekcie w ostatnim 20-leciu wśród nowo rejestrowanych produktów leczniczych przez Agencję do Spraw Żywności i Leków (*Food and Drug Administration, FDA*) dominują leki w postaci pojedynczego enancjomeru albo substancje o charakterze achiralnym a nieliczne rejestrowane produkty są w postaci racematów. Jedną z metod wykorzystywanych w celu uzyskania enancjomerycznie czystych związków na drodze rozdzielania

mieszaniny racemicznej jest rozdział kinetyczny, polegający na przekształcaniu z różną szybkością dwóch enancjomerów w obecności biologicznego lub chemicznego katalizatora.

Oceniana praca doktorska mgr. Joanny Chałupka wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Marszałła jako promotora, jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów biologicznych. Wyniki badań Doktorantki znalazły odzwierciedlenie w 3 artykułach oryginalnych oraz jednym przeglądowym opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports* (JCR) takich jak m.in.: *Current Organic Chemistry*, *Catalysts*, i *International Journal of Molecular Sciences* w okresie od 2020 do 2023 roku. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor*, IF) wszystkich publikacji to blisko 17,4. We wszystkich wymienionych artykułach p. mgr Chałupka jest pierwszym autorem. Oświadczenia współautorów wszystkich publikacji potwierdzają istotną rolę oraz wiodące zaangażowanie Doktorantki w realizację badań oraz powstawanie prac. Wymienione w oświadczeniach do publikacji czynności twórcze mgr Joanny Chałupki są wyraźnie opisujące Jej zaangażowanie w realizację badań i sprowadzają się do opracowania koncepcji badań, zaprojektowania i przeprowadzenia eksperymentów badawczych, analizy i interpretacji danych, pisania manuskryptów, jak również odpowiadania recenzentom i poprawiania manuskryptów po recenzji. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych.

Całkowity dorobek publikacyjny Doktorantki, razem z pracami stanowiącymi podstawę osiągnięcia naukowego opisywanego w pracy doktorskiej, na dzień składania rozprawy doktorskiej, to wg bazy *Scopus* w sumie 7 prac (w czterech z nich jest pierwszą autorką) o sumarycznym IF wynoszącym 27,5. Mgr Joanna Chałupka brała udział w konferencjach w kraju i zagranicą w tym 6-krotnie wygłaszając referaty ustne. Doktorantka jest wykonawcą grantu PRELUDIUM finansowanego ze źródeł

Narodowego Centrum Nauki, który stał się podstawą finansowania badań w doktoracie oraz wykonawcą w innych projektach finansowanych przez NCBiR, LIDER XII oraz Szybka Ścieżka. Mgr Joanna Chałupka została wyróżniona trzykrotnie Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK w Toruniu, czterokrotnie Stypendium Projakościowym dla doktorantów oraz Stypendium dla doktorantów w ramach programu "Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza" IDUB.

Rozprawa doktorska Doktorantki Joanny Chałupki jest napisana w języku polskim i obejmuje ponad 150 stron przedstawiających w rozszerzonej wersji wstęp, a następnie cel pracy, wyniki oraz dyskusję i wnioski. We wstępie szczegółowo opisano zagadnienia związane z problematyką izomerii oraz chiralności substancji czynnych, kwestie podstawowe dotyczące enzymów oraz enzymatycznego rozdzielania kinetycznego jako metody otrzymywania związków chiralnie czystych, oraz omówione zostały cieczy jonowe ich charakterystyka, metody otrzymywania oraz zastosowania cieczy jonowych, w tym, w procesie rozdzielania kinetycznego racematów. Całość tej bardzo dobrze napisanej części pracy zamyka opis parametrów opisujących enancjoselektywność reakcji a konkretnie nadmiar enancjomeryczny, enancjoselektywność oraz konwersja.

Cel pracy doktorskiej został prawidłowo sformułowany i przedstawiony w zwięzły sposób, dodatkowo z uwzględnieniem tzw. celów szczegółowych jakie były konieczne do osiągnięcia celu nadrzędnego.

Następnie szczegółowo omówione zostały wyniki pracy, za każdym razem poprzedzając kopię manuskryptu publikacji składającego się na podstawą osiągnięcia doktorskiego. Ostatecznie, na zakończenie dysertacji, na dwóch stronach przedstawione zostały wnioski z przeprowadzonych badań. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składają się 113 pozycje literaturowe, z czego

większość to publikacje, które ukazały w ciągu ostatnich 10 lat. Całość rozprawy uzupełniają wykaz użytych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis rycin oraz oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach. Do rozprawy dołączone zostały, w postaci osobnego rozdziału, zaświadczenia o udziale w grantach jak również pozostałe osiągnięcia naukowe Doktorantki, w tym inne niż zgłoszone w rozprawie publikacje naukowe, wymieniony został udział w konferencjach naukowych, oraz staże naukowe w ośrodkach akademickich.

Podstawowym celem pracy była optymalizacja 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. Osiągnięcie powyższego celu zostało warunkowane zrealizowaniem kolejnych etapów badawczych, polegających na optymalizacji procesu rozdzielania 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; optymalizacji 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 oraz testowaniu i ocenie aktywności wykorzystanych lipaz w kolejnych cyklach reakcyjnych enancjoselektywnej biotransformacji (R,S)-atenololu, (R,S)-1-fenyletanolu oraz (R,S)-klopidogrelu.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktorantki, które w mojej ocenie zasługują na szczególne uznanie, należą opisane w dysertacji:

- zaobserwowanie istotnego wpływu zastosowania cieczy jonowych w rozdzieleniach kinetycznych (R,S)-atenololu, (R,S)-1-fenyletanolu oraz kwasu karboksylowego (R,S)-klopidogrelu,

- wykazanie, iż ciecze jonowe wpływają na konformację lipaz poprzez międzycząsteczkowe oddziaływania typu jonowego, dipolarnego, wiązania wodorowe lub van der Waalsa prowadząc do inhibicji lub hiperaktywacji biokatalizatorów w rozdziałach kinetycznych racematów;

- wykazanie, że spośród testowanych cieczy jonowych to [EMIM][BF<sub>4</sub>] najkorzystniej wpływa na aktywność katalityczną oraz enancjoselektywność lipaz z *Candida rugosa* oraz *Burkholderia cepacia*;

- określenie wysokiej aktywności katalitycznej oraz enancjoselektywności lipaz z *Candida rugosa* oraz *Burkholderia cepacia* mimo wykorzystania w 5-ciu kolejnych cyklach katalitycznych.

Praca doktorska mgr Joanny Chałupki jest bardzo wartościowa i posiada niezaprzeczalne elementy nowości naukowej, niemniej jednak wypada zwrócić również uwagę na nieliczne aspekty rozprawy, które budzą pytania bądź wymagają dodatkowego wyjaśnienia. Do edytorsko-stylistycznych uwag zaliczyłbym nieprawidłowe użycie terminu 'rozdział' zamiast 'rozdzielanie'. Zgodnie z przyjętą przez Komitet Chemii Analitycznej PAN terminologią chromatograficzną za opublikowaną monografią „Chromatografia i techniki elektromigracyjne” autorstwa prof. Zygryda Witkiewicza i prof. Ewy Śliwki prawidłową formą jest rozdzielanie. Jakie są możliwe perspektywy prowadzenia dalszych badań Doktorantki związanych z wykorzystaniem cieczy jonowych w analizie związków chiralnych?

Powyższa uwaga i pytanie nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska Pani Joanny Chałupki ma istotne walory nowości i oryginalności naukowej. Przygotowanie Doktorantki w zakresie analizy farmaceutycznej szczególnie aspektów analizy związków chiralnych, ale również w obszarze bioanalityki, jak również umiejętne ocena uzyskanych wyników i wyważona ich interpretacja budzą uznanie.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Chałupki spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 r. z późniejszymi zmianami. Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Joanny Chałupki do publicznej obrony tej pracy przedstawionych w dysertacji.

