

Warszawa, dnia 25.10.2022 r.

Prof. dr hab. Andrzej Leś

Profesor emerytowany

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Pasteura 1, 02-093 Warszawa

email: ales@tiger.chem.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr n. farm. Ewy Jurczak

pt. „Otrzymywanie i analiza nowych form cytrynianu sildenafilu”

wykonanej w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem dr hab. n. farm. Łukasza Szeleszczuka (jako promotora)
oraz dr n. farm. Moniki Zielińskiej-Pisklak (jako promotora pomocniczego)

Nowoczesne metody instrumentalne na stałe weszły do laboratoriów zajmujących się badaniami nad lekiem. Widać to było na niedawnej konferencji naukowej ACCORD 2022 (Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, 26-28 May, 2022, Banacha Campus, Medical University of Warsaw), która pokazała jak wiele wysokiej klasy instrumentów trzeba użyć, aby uzyskać wartościowe rezultaty. Jednocześnie odnotowano znaczny rozwój multidyscyplinarnych badań nad lekiem. Sytuacja taka stawia nowe wyzwania dla młodszych pracowników nauki, którzy poświęcili swój czas i zaangażowanie w zgłębianiu niełatwych problemów wytwarzania nowych leków.

W takim świetle rozpatrywać można rozprawę doktorską Pani mgr n. farm. Ewy Jurczak pt. „Otrzymywanie i analiza nowych form cytrynianu sildenafilu”.

Badania nad niektórymi własnościami sildenafilu były prowadzone w Zakładzie Chemii Fizycznej kilkanaście lat temu pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Wawer, ale dopiero niedawno można było badania te znacznie pogłębić, a także podjąć niełatwy problem powiększenia rozpuszczalności aktywnego składnika leku stosowanego w zaburzeniach erekcji, tj. cytrynianu sildenafilu.

Tak więc przedstawiona do oceny rozprawa zmierza do poszerzenia wiedzy o właściwościach monohydratu cytrynianu sildenafilu oraz nowych bezwodnych form cytrynianu sildenafilu. Motywem przewodnim podjętych badań jest zgromadzenie argumentów wspierających hipotezę, że niską biodostępność monohydratu cytrynianu sildenafilu można zwiększyć, jeżeli zastosuje się bezwodne formy stałe cytrynianu sildenafilu jako API (ang. Active Pharmaceutical Ingredient) w tabletkach.

Lektura rozprawy umożliwia wyodrębnienie następujących celów:

Cel 1: Uzupelnienie wiedzy nt. komercyjnie dostępnego monohydratu sildenafilu o termogramy TGA – DSC w celu wyznaczenia granicznej temperatury występowania postaci krystalicznej oraz bezpiecznej temperatury odwadniania poprzez wygrzewanie.

Cel 2: Otrzymanie nowych bezwodnych form cytrynianu sildenafilu poprzez odpowiednie wygrzewanie monohydratu cytrynianu sildenafilu.

Cel 3: Uzyskanie danych strukturalnych i spektralnych nowych bezwodnych form cytrynianu sildenafilu w rezultacie zastosowania spektrometrii FT-IR ATR, Ramana, ^{13}C CP MAS NMR, teoretycznych metod kwantowych i symulacyjnych, techniki PXRD wraz z oceną krystaliczności uzyskanych nowych form.

Cel 4: Ocena kinetyki uwalniania cytrynianu sildenafilu z tabletek (zawierających nowe bezwodne formy) w medium zbliżonym do soku żołądkowego

Podjęcie się realizacji tych celów było możliwe dzięki merytorycznemu przygotowaniu Doktorantki.

Doktorantka zdobyła solidne doświadczenie i nabyła odpowiednie umiejętności w zakresie posługiwania się nowoczesnymi metodami fizyko-chemicznymi wykorzystywanymi w farmacji. Można o tym przekonać się zarówno po lekturze niniejszej rozprawy, jak i w cytowanej współautorskiej publikacji [Piśmiennictwo, poz. 130] i w uzyskanym patencie na wytwarzanie 17-beta-estradiolu [Piśmiennictwo, poz. 88]. To są materiały, w których współautorami, oprócz Doktorantki, są znakomici specjaliści, dr hab. n. farm. Łukasz. Szeleszczuk, dr. hab. n. farm. Dariusz Maciej Pisklak, dr n. farm. Monika Zielińska-Pisklak.

Sposób prezentacji materiału doświadczalnego i teoretycznego będącego podstawą rozprawy.

Ogólna konstrukcja rozprawy jest zbliżona do wersji tradycyjnych. Rozprawa podzielona jest na 7 rozdziałów, w których omawia się cel pracy, przedstawia obiekt badawczy (sildenafil), zastosowane metody badawcze oraz uzyskane obszernie wyniki wraz z dyskusją i cytowaną literaturą, łącznie na 193 stronach..

Cechą wyróżniającą obecną rozprawę są bardzo szczegółowe opisy przeprowadzonych doświadczeń oraz zastosowanej aparatury pomiarowej.

Ponadto uwagę zwraca szerokie spektrum zastosowanych metod fizykochemicznych obejmujących analizę termiczną, metody spektroskopii oscylacyjnej, NMR, UV-VIS, krystalochemii, analizy powierzchni, kinetyki rozpuszczania tabletek oraz metody chemii obliczeniowej.

Wyniki uzyskane w rozprawie nie były jeszcze opublikowane. W spisie literatury występują dwie publikacje [poz. 88 oraz poz.130], których współautorką jest Doktorantka. Są to uzyskany patent oraz publikacja w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Obie te publikacje nie są bezpośrednio związane z obiektem badań w rozprawie. Niemniej warto podkreślić, że wiele metod badawczych omawianych w tych publikacjach było zastosowanych w obecnej rozprawie. Doktorantka jest również współautorką obszernej pracy przeglądowej nt. farmaceutycznych hydratów w czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej [Jurczak E. i inn., *Pharmaceutics*, 2020, 12, 959] , a także trzech popularno-naukowych publikacji nt. solwatacji w farmacji [Jurczak E. i inn., *Lek w Polsce*, 2017, 5, 56-65], biodostępności leków [Jurczak E. i inn., *Lek w Polsce*, 2017, 3, 54-59] oraz właściwości estradiolu [Jurczak E. i inn., *Gabinet Prywatny*, 2016, 23, 42-50].

Ogólne wrażenie po lekturze rozprawy:

Rozprawa przedstawia bardzo szczegółowo przeprowadzone doświadczenia wraz z krytyczną oceną zarówno własnych wyników, jak i wyników uzyskanych przez innych badaczy. Świadczy to o dużej dojrzałości Doktorantki w prowadzeniu współczesnych badań naukowych w farmacji. Główne cele rozprawy zostały osiągnięte i szczegółowo udokumentowane. Nie zauważyłem usterek w rozprawie, które mogłyby podważyć którykolwiek z uzyskanych wyników. Krytyczne uwagi przedstawione niżej mają w większości charakter komentarzy, bądź stwierdzeń uściślających niektóre stwierdzenia Doktorantki.

UWAGI KRYTYCZNE I KOMENTARZE

[1] Trochę niezręcznie sformułowane zdanie znajduje się w rozdziale 7 pt. Podsumowanie i wnioski, str. 183/193:

„...Starania te poczyniłam w celu rozwiązania ważnego problemu naukowego, jakim jest niska biodostępność tej API...” .

Zdanie to sugeruje, jakoby postawiony problem naukowy był w rozprawie analizowany i chociaż częściowo rozwiązany. Jak jednak wynika z lektury rozprawy Doktorantka chciała zapewne powiedzieć, że wskazany problem naukowy (tj. biodostępność API) jest jedynie dalekosiężnym celem do osiągnięcia w przyszłości, a metody badawcze rozwinięte w rozprawie mają przybliżać Ją do osiągnięcia tego celu.

Zdanie o podobnym wydźwięku pojawia się we wstępie (str. 11/193) , w którym Doktorantka pisze, że zamierza

„...podjąć (w tej pracy) próbę modyfikacji dostępności biologicznej cytrynianu sildenafilu poprzez uzyskanie jego nowych form w fazie stałej.”

Rzeczywiście, Doktoranta wykonała wiele szczegółowych badań różnymi metodami fizyko-chemicznymi i teoretycznymi w zakresie nowych form stałych sildenafilu, jakie uzyskała, natomiast nie zauważyłem w rozprawie badań umożliwiających ocenę sposobu, w jaki te nowe formy stałe wpływają na biodostępność sildenafilu. Niewielka, dość ogólnikowa, wzmianka na taki temat (na str. 49/193) informuje, że „...większa rozpuszczalność i powierzchnia kontaktu substancji z medium, zamiana formy krystalicznej API na postać amorficzną, przyspieszają uwalnianie API z gotowego leku.”

To ogólnikowe zdanie dobrze by było wesprzeć wskazaniem odpowiedniej literatury.

Omawiając cele rozprawy (str. 12/193) Doktorantka nie kontynuuje omawiania problemu „dostępności biologicznej” lecz koncentruje się na „dostępności farmaceutycznej”.

Reasumując, uważam, że relacja pomiędzy dostępnością farmaceutyczną oraz biodostępnością wraz ze znaczeniem takich badań dla porównywania różnych form leku powinna znaleźć się w rozdziale poświęconym dyskusji wyników.

[2] str. 8/193 (Indeks skrótów) jest: „ NVT – (ang. „

Ten skrót nie ma objaśnienia. Należałoby rozwinąć ten skrót w języku angielskim oraz wyjaśnić po polsku.

Również nieobjaśniony jest skrót BCA w Tabeli 35 i 36.

[3] str. 12/193: Zdanie następujące:

„...W przypadku wielu powszechnie stosowanych API wykazano większą rozpuszczalność i korzystniejszy profil rozpuszczania form bezwodnych substancji leczniczych w porównaniu do ich hydratów.”

Komentarz: To zdanie powinno mieć odnośnik do literatury, w której dyskutowano większą rozpuszczalność bezwodnych form vs. ich hydraty.

[4] str. 145/193, zdanie: *„...w obliczeniach uwzględniony był tylko jeden punkt czasowy, dla którego poziom uwolnienia badanej substancji wyniósł powyżej 85% procent, a więc uwzględniono jedynie piętnaście pierwszych punktów czasowych.”.*

Powyższe zdanie wymaga jednak objaśnienia. Które punkty czasowe (kolumna Czas, łącznie 24 punkty czasowe) dla każdej z badanych form były uwzględnione w obliczeniach ?

[5] Komentarz: Jaki sens mają ujemne wartości 95 % DPU dla SILD_CYT_UWD w Tabeli 33 i 34, str. 148-149/193 ?

[6] Na Ryc. 71, str. 150/193 występuje krzywa oznaczona jako SILD_CYT_LIOF_LOD, która nie była omawiana w rozprawie. Natomiast w Tabeli 35 i 36 , str. 151/193 jest kolumna f1 i f2 dla SILD_CYT_LIOF_ZM, ale ta forma nie jest prezentowana na Ryc. 71. Czy jest to rezultat przejęzyczenia i SILD_CYT_LIOF_LOD oraz SILD_CYT_LIOF_ZM są różnymi nazwami tej samej formy ?

[7] str. 67/193 oraz str. 144/193 : zauważyłem zamienione nazwy współczynników f1 i f2:

Powinno być: f2 – współczynnik podobieństwa, f1 – współczynnik różnicy.

[8] Komentarz, str. 160/193:

„...Warto nadmienić, że woda występująca w strukturach cytrynianu sildenafilu nie jest akceptorem żadnego wiązania wodorowego, natomiast wodory tworzą wiązania wodorowe z tlenem niezdysocjowanej grupy karboksylowej cytrynianu oraz z resztą sulfonową cytrynianu...”

Chyba nastąpiło przejęzyczenie: zamiast *„...resztą sulfonową cytrynianu.”* powinno być *„...resztą sulfonową sildenafilu.”*

[9] Z zainteresowaniem zapoznałem się z badaniami monohydratu sildenafilu.

Wykonane przez Doktorantkę termogramy DSC-TGA umożliwiły wyznaczenie temperatur 192.0 °C, 199.83 °C oraz 306.76 °C, które są granicznymi temperaturami odpowiednio odwadniania, występowania postaci krystalicznej oraz rozkładu monohydratu cytrynianu sildenafilu. Wyznaczone zostały ponadto zmiany entalpii procesów podczas ogrzewania nowych bezwodnych form cytrynianu sildenafilu.

[10] Równie interesujące są badania teoretyczne metodami chemii obliczeniowej stopniowego usuwania cząsteczek wody z komórki elementarnej uwodnionego kryształu cytrynianu sildenafilu oraz ocena zmian entalpii stopniowej dehydratacji.

[11] Zwraca uwagę dyskusja Doktorantki nt. jednej ze struktur cytrynianu sildenafilu (KAJYIG). Doktorantka wykazała się bardzo uważnym i krytycznym spojrzeniem na dane strukturalne dostępne w literaturze naukowej. Świadczy o tym Jej analiza struktury „hemihydratu cytrynianu sildenafilu” o kodzie KAJYIG z bazy CCDC. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują, że struktura KAJYIG powinna być nazywana monohydratem cytrynianu sildenafilu, str. 71/193 .

[12] str. 173/193: Komentarz do opinii Doktorantki nt. poprawności obliczeń teoretycznych.

Wykonane przez Doktorantkę obliczenia z korektą i bez korekty na oddziaływania dyspersyjne w metodzie DFTB+ są racjonalne, o ile kryterium „poprawności” obliczeń jest teoretyczne odtworzenie empirycznych wymiarów komórki elementarnej w kryształach. Badając inny problem (str. 131/193) Doktorantka przypisuje większą „poprawność” obliczeń na podstawie większej wartości współczynnika korelacji (pomiędzy obliczonymi i eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych ^{13}C). Należy jednak stwierdzić, że ze zgodności pomiędzy wynikami teoretycznymi i eksperymentalnymi nie wynika jednoznacznie poprawność obliczeń. Chyba lepiej byłoby odnieść się do przewidywalności wyników doświadczalnych przez konkretną wersję podejścia teoretycznego, zamiast na podstawie wyników doświadczalnych oceniać poprawność teorii, która posługuje się całą gamą licznych przybliżeń i założeń (w szczególności teoria półempiryczna).

[13] Tabela 36, str. 151/193:

Wobec skąpej ilości punktów doświadczalnych wartość porównawcza obliczonych współczynników f_1 i f_2 jest niewielka. Zdecydowanie bardziej przekonująco wygląda porównanie profili rozpuszczania na Ryc. 71, str. 150/193. Widać tam trzy przebiegi rozpuszczania trzech nowych form, z których jeden jest wyraźnie odstający od pozostałych. Taki jakościowy wynik (jedna bezwodna forma amorficzna, tj. SILD_CYT_LIOF_ZM, lepiej rozpuszcza się, niż pozostałe dwie formy bezwodne, tj. SILD_CYT_LIOF_N2 lub SILD_CYT_BZW). Jest to ważny wynik, który wnosi istotny wkład do poszerzenia wiedzy nt. nowych bezwodnych form stałych opracowanych przez Doktorantkę. Nieco bardziej szczegółowy ogląd kinetyki rozpuszczania można byłoby otrzymać obliczając np. pierwszą pochodną rozpuszczalności po czasie (odpowiednik szybkości rozpuszczania).

[14] Widmo ^{13}C CP MAS, tabela 23, str. 122/193:

Wszystkie (łącznie 21) przesunięcia chemiczne zarejestrowane dla SILD_CYT_UWD i wyszczególnione w Tabeli 23 zostały przypisane do odpowiednich przesunięć opublikowanych w pracy I. Wawer et al. (2005) ref. [125]. Natomiast jedno przesunięcie chemiczne o wartości 15.1 ppm zinterpretowane w pracy I. Wawer et al. jako pochodzące od grupy metylowej (atom węgla Nr 21 reszty $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) nie zostało uwzględnione w Tabeli Nr 23.

Jaka jest przyczyna ominięcia przesunięcia chemicznego (15.1 ppm) w Tabeli 23 ?

Najważniejsze osiągnięcia w rozprawie.

Doktorantka wykazała, że w literaturze nie było wcześniej doniesień nt. form bezwodnych cytrynianu sildenafilu. W związku z tym opracowała metodę wytworzenia trzech nowych form, tj. jednej formy krystalicznej (SILD_CYT_BZW) oraz dwóch form o przeważającej komponentce amorficznej (SILD_CYT_LIOF_N2 i SILD_CYT_LIOF_ZM). Wykazała również, że rozpuszczalność nowych form nie jest jednakowa, przy czym największą rozpuszczalność (w czasie krótszym, niż ok. 10 minut) wykazuje forma oznaczona symbolem SILD_CYT_LIOF_ZM.

Właściwości strukturalne każdej z uzyskanych form zostały szczegółowo zbadane przy pomocy wielu metod fizykochemicznych, takich jak ^{13}C CP MAS ssNMR, FTIR-ATR, Raman, UV-VIS do kinetyki rozpuszczania nowych form, PXRD, obrazowania metodą skaningowej

mikroskopii elektronowej oraz teoretycznych metod kwantowych i dynamiki molekularnej z wykorzystaniem pakietu CASTEP.

Opracowane nowe bezwodne formy cytrynianu sildenafilu mogą być wykorzystane do opracowania technologii wytwarzania nowych form tabletek o modyfikowanym uwalnianiu.

Niewykluczone, że po zapoznaniu się ze stanem techniki można będzie sformułować odpowiedni wniosek patentowy nt. unikatowej metody wytwarzania nowych bezwodnych form cytrynianu sildenafilu.

Ocena ogólna.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań instrumentalnych i teoretycznych wraz z dogłębną analizą wyników pozwalają na stwierdzenie, że rozprawa spełnia wszystkie kryteria, jakie powinna spełniać rozprawa doktorska zgodnie z art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669).

W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych o dopuszczenie Pani mgr farm. Ewy Jurczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego rekomendując jednocześnie wyróżnienie rozprawy.