



Dr hab. inż. Izabela Madura, prof. PW
Katedra Chemii Nieorganicznej
Email: izabela@ch.pw.edu.pl

Warszawa, 10 maja 2019 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr farm. Agnieszka Kozak (d. Sokal)

p.t. KOKRYSTAŁY ETENZAMIDU - BADANIA STRUKTURALNE, FIZYKOCHEMICZNE

I FARMACEUTYCZNE

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr farm. Agnieszki Kozak została przygotowana w Zakładzie Chemii Analitycznej (będącego częścią Katedry Chemii Analitycznej i Biomateriałów) na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Wacława Kołodziejewskiego oraz Pani dr hab. n. farm. Edyty Pindelskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego. Dysertacja dotyczy otrzymywania, analizy strukturalnej oraz badań fizykochemicznych i farmaceutycznych kokryształów etenzamidu – związku należącego do niesteroidowych leków przeciwzapalnych, a charakteryzującego się słabą rozpuszczalnością w roztworach wodnych i tym samym niską biodostępnością. Za jeden z głównych celów Doktorantka postawiła sobie otrzymanie i zbadanie właściwości kokryształów etenzamidu o lepszych właściwościach fizykochemicznych niż sam lek.

Rozprawę doktorską mgr farm. Agnieszki Kozak stanowi opracowanie w języku polskim, wsparte pięcioma publikacjami w języku angielskim o imponujących sumarycznych wskaźnikach: Σ IF = 24,710 oraz Σ pkt MNiSW = 190. W spójnym tematycznie cyklu znalazły się dwie prace (P1-P2) o charakterze przeglądowym oraz trzy (P3-P5) przedstawiające wyniki badań własnych. Według załączonych do każdej publikacji oświadczeń współautorów wynika, że w pracach oryginalnych P3-P5 Doktorantka miała wiodący udział (od 50 do 70%) i we wszystkich jest pierwszym autorem. Ponadto, w pracach P1 oraz P5 jest ona zarówno pierwszym, jak i autorem korespondencyjnym.

Opracowanie w języku polskim zawiera się na 55 stronach i składa się z jedenastu rozdziałów, w tym streszczeń w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów i akronimów oraz wykazu dorobku Doktorantki z wylistowanymi publikacjami wchodzącymi w skład cyklu.



Merytoryczna część będąca swoistym komentarzem do cyklu publikacji stanowiących integralną część rozprawy zamieszczona została na 40 stronach i składa się z następujących rozdziałów: Wprowadzenie, Cele pracy, Omówienie i dyskusja wyników, Aspekty nowości w pracy, Wnioski oraz Bibliografia (45 pozycji). Komentarz jest poprawnie zredagowany, przejrzyste napisany i zadowalająco spełnia rolę wprowadzenia do części merytorycznej, którą stanowią kopie pięciu prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, a mianowicie *Current Pharmaceutical Design*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *International Journal of Pharmaceutics*, *Advance Drug Delivery Reviews*.

Praca została starannie przygotowana od strony redakcyjnej. Pewną niedogodność sprawiła słaba rozdzielczość załączonych publikacji (zarówno w wersji drukowanej jak i pliku pdf), wynikająca niewątpliwie z chęci ujednolicenia numeracji storn i nagłówka w całej pracy. Język rozprawy jest poprawny, choć wkradło się kilka błędnych tłumaczeń z języka angielskiego (np. na str. 15: po polsku powinno być miliard dolarów a nie bilionów dolarów). Również niepoprawnie został rozwinięty skrót programu CASTEP (Wykaz skrótów i akronimów oraz na stronie 33) – powinno być *Cambridge Serial Total Energy Package*. Na szczęście te drobne uchybienia oraz nieliczne literówki nie wpływają na czytelność tekstu i jego zrozumienie.

Od strony merytorycznej, rozdział zatytułowany „Wprowadzenie” to 12 stronicowe omówienie najważniejszych pojęć związanych z tematyką pracy. Na wstępie Autorka zwięźle nakreśliła zasadność badań nowych form krystalicznych znanych substancji farmakologiczne aktywne (tzw. API), a następnie przedstawiła dyskusję dotyczącą definicji kokryształów oraz sposoby ich otrzymywania, wyodrębniając jako oddzielny podrozdział kokryształy farmaceutyczne. Podział ten wydaje się być niepotrzebny, można jednak przypuszczać, że Doktorantka wyodrębniła ten podrozdział chcąc się w bezpośredni sposób odnieść to treści pracy przeglądowej (P1) zatytułowanej „*Pharmaceutical cocrystals as an opportunity to modify drug properties: From the idea to application: A review*”, a opublikowanej w czasopiśmie *Current Pharmaceutical Design*. Praca ta ukazuje zalety kokryszalizacji w aspekcie farmaceutycznym na przykładzie wybranych kokryształów znanych leków, w tym etenzamidu. Podkreślone w niej zostało, jak kokryszalizacja wpływa na poprawę właściwości API takich jak np. biodostępność, stabilność, łatwość tabletkowania. Zwrócono też uwagę na znaczenie kokryształów utworzonych z dwóch substancji farmakologicznie aktywnych, mogących niejednokrotnie działać synergicznie. W publikacji P1



zaprezentowana została również cała procedura prowadząca od powstania pomysłu na nowy kokryształ farmaceutyczny, aż do etapu uzyskania pozwolenia na wprowadzenie substancji do obrotu.

W osobnym podrozdziale Komentarza (6.3) znalazły się informacje na temat właściwości farmaceutycznych etenzamidu oraz przykłady znanych modyfikacji tego leku, które stosuje się celem poprawy jego rozpuszczalności. Doktorantka odniosła się do formulacji dostępnych na rynku jak i do form etenzamidu scharakteryzowanych w oparciu o badania dyfrakcji rentgenowskiej na monokryształach, a zdeponowanych w bazie danych krystalograficznych CSD. W ostatnim podrozdziale „Wprowadzenia” przedstawione zostały metody charakteryzacji kokryształów i jest on związany z publikacją przeglądową (P2) zatytułowaną „*Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques*”, która ukazała się w prestiżowym czasopiśmie *Advance Drug Delivery Reviews* (IF = 11.764). Według oświadczeń Promotorów udział mgr farm. Agnieszki Kozak w powstaniu tej pracy to 30%. Z treści Komentarza jak i oświadczeń współautorów wszystkich prac cyklu wynika, że Doktorantka w dużym stopniu opanowała techniki spektroskopowe oraz metody badania właściwości farmaceutycznych kokryształów, i właśnie te fragmenty dominują (i słusznie) w polskim Komentarzu w rozdziale 6.4. Należy podkreślić, że praca P2 stanowi cenne opracowania na temat technik istotnych w badaniach strukturalnych, termodynamicznych oraz szeroko pojętych zagadnień farmaceutycznych, dostarczających informacji na temat API. Należy podkreślić, że informacje te pozwalają lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy działania leków (czystych związków bądź formulacji), a także są niezwykle przydatne do prawidłowego prowadzenia procesów wytwarzania leku w postaci stałej. Warta zauważenia jest multidyscyplinarność podejścia do uzyskania informacji na temat budowy i właściwości stałych substancji leczniczych, co Doktorantka z powodzeniem wykorzystwała współpracując z krystalografami i teoretykami.

Omówiony powyżej rozdział stanowi spójną całość z jasno sprecyzowanymi „Celami pracy”, które odnoszą się do oryginalnych badań przeprowadzonych przez mgr farm. Agnieszkę Kozak i opublikowanych w pracach P3-P5. Zastosowany podział, w którym prace przeglądowe stanowią wprowadzenie do Komentarza, a publikacje dotyczące wykonanych samodzielnie badań znajdują się w rozdziale „Omówienie i dyskusja wyników badań” jest oryginalny i uważam, że ze wszystkich miar zasadny, bo w klarowny sposób pokazuje postawiony i rozwiązany problem badawczy,



którego podjęła się Doktorantka przyczyniając się do rozwoju nauki. Wspomniany rozdział składa się z trzech podrozdziałów, z których każdy nawiązuje do jednej z publikacji, przedstawiając jej genezę, kontekst badawczy, najistotniejsze wyniki (również te nieopublikowane) oraz konkluzje.

Jako pierwszy temat badawczy, opublikowany w pracy P3 zatytułowanej „*Pharmaceutical properties of two etenzamide-gentisic acid cocrystal polymorphs: Drug release profiles, spectroscopic studies and theoretical calculations*”, która ukazała się w czasopiśmie *International Journal of Pharmaceutics*, Doktorantka wybrała analizę kokryształów dwóch form polimorficznych etenzamidu z kwasem gentyzynowym. Obie formy były opisane wcześniej w literaturze i na podstawie tych danych mgr Kozak je otrzymała, a następnie scharakteryzowała wykorzystując metody spektroskopowe: magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym (SSNMR) i spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Wskazała, że za pomocą SSNMR w prosty sposób można określić czy w ogóle otrzymano kokryształy, która ich forma polimorficzna powstała oraz potwierdzić homogenności próbek czy też obecności ewentualnego nadmiaru koskładnika w próbce. Doktorantka wykazała także, że podczas procesu tabletkowania następuje niekorzystna przemiana fazowa. Jako sposób zachowania w tabletkce metastabilnej formy kokryształu o lepszej rozpuszczalności zaproponowany został dodatek powszechnie używanych substancji pomocniczych takich jak jednowodna laktoza, skrobia ziemniaczana czy PROSOLV HD90. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki tych badań stanowią podstawę zgłoszenia patentowego P.418702: „Kompozycja farmaceutyczna w postaci tabletki zawierająca etenzamid”, którego mgr farm. Agnieszka Kozak jest współautorką. Nowe kompozycje zostały również szczegółowo przebadane pod kątem ewentualnych interakcji kokryształu z substancją pomocniczą oraz wyznaczono dla nich profile uwalniania etenzamidu w środowisku wodnym i w sztucznym płynie żołądkowym. W konkluzji stwierdzono, że wyniki tych badań pozwalają na zaprojektowanie zarówno tabletki o szybkim działaniu, jak i tabletki o przedłużonym/opóźnionym uwalnianiu substancji leczniczej.

W kolejnej pracy, P4, zatytułowanej „*Structural characterization and pharmaceutical properties of three novel cocrystals of etenzamide with aliphatic dicarboxylic acids*” opublikowanej w *Journal of Pharmaceutical Sciences* mgr farm. Agnieszka Kozak postanowiła otrzymać i przebadać nowe kokryształy z etenzamidem, w tym przypadku z kwasami dikarboksyłowymi takim jak kwas malonowy, maleinowy i glutarowy. Należy zaznaczyć, że



Doktorantka wykonała szereg prób otrzymywania kokryształów etenzamidzu, których wyniki zebrala w Tabeli 1 Komentarza. We wszystkich przypadkach, jako koskladnik wybierane byly substancje z listy GRAS (*Generally Recognized As Safe*), juz na poczatku wskazujace na przemyslane dzialania Doktorantki, ktore moglyby zakonczyc sie sukcesem o znaczeniu aplikacyjnym. Otrzymane trzy nowe kokryształy etenzamidu zostaly w pełni scharakteryzowane strukturalnie. Podejście multidyscyplinarne wykorzystujace badania dyfrakcji rentgenowskiej na monokryształach, SSNMR oraz skaningową kalorymetrię różnicową (DSC) pozwoliło jednoznacznie wykazać porowatą strukturę kokryształu etenzamidu z kwasem malonowym, zachowaną mimo ewaporacji/dyfuzji słabo związanego w kryształach rozpuszczalnika z suchej próbki. W publikacji tej znalazły się też wyniki badań dotyczące analizy profili uwalniania etenzamidu z tabletek kokryształów odniesione do tabletki czystego etenzamidu. Wynika z nich, że dla wszystkich otrzymanych przez Doktorantkę kokryształów rozpuszczalność została poprawiona, a kokryształy te można zastosować w formie tabletek leku o przedłużonym uwalnianiu, szczególnie poszukiwanych w procesie leczenia bólu przewlekłego.

O uzyskanych przez mgr farm. Agnieszkę Kozak wysokich kompetencjach do samodzielnego prowadzenia badań naukowych świadczy praca P5 „*Spectroscopic analysis of the influence of various external factors on the etenzamide-glutaric acid (1:1) cocrystal formation*” opublikowana wspólnie z promotorką pomocniczą pracy dr hab. n. farm. Edytą Pindelską w *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Warty zauważenia jest zarówno duży wkład Doktorantki (70%) jaki i jej rola jako autora korespondencyjnego. W publikacji przedstawiono wyniki szczegółowych badań wpływu czynników zewnętrznych takich jak czas ucierania w procesie mechanosyntezy, nacisk stempla podczas tabletkowania, czas przechowywania próbek oraz wpływ szybkiego wirowania pod kątem magicznym w trakcie wykonywania eksperymentów SSNMR na proces powstawania kokryształu etenzamidu z kwasem glutarowym. Warte odnotowania jest przeprowadzenie eksperymentu kokrysztalizacji *in situ* podczas wirowania próbki pokazujące, że w przypadku analizy SSNMR produktów złożonych mogą zachodzić istotne zmiany w ich strukturze, wpływając jednocześnie na ich właściwości fizykochemiczne i farmaceutyczne, co może w efekcie powodować zafałszowywanie wyników badań.

W podsumowaniu, również trochę nietypowo ujętym, Doktorantka wyodrębniła dwa rozdziały, Aspekty nowości w pracy i Wnioski (wg. mnie przedstawiono podsumowanie, a nie



wnioski), gdzie w punktach podała najważniejsze osiągnięcia. Z punktu widzenia recenzenta jest to bardzo wygodne, szczególnie w pracach doktorskich będących cyklem publikacji, często wieloautorskich. Z przedstawionych punktów jasno wynika co Doktorantka uważa za swoje najważniejsze dokonania i jakie badania/opracowania wyniknęły z toku prac przez nią prowadzonych. Uważam, że wymienione przez mgr farm. Agnieszkę Kozak aspekty nowości znalazły się w wynikach badań wszystkich trzech prac oryginalnych i dotyczą przede wszystkim tematów bardzo istotnych z punktu widzenia zastosowań farmaceutycznych. Na wartość odnotowania zasługują wyniki pokazujące szeroki wachlarz wykorzystania technik spektroskopowych, w tym szczególnie SSNMR. Tu należy podkreślić, że Doktorantka wyśmienicie opanowała te techniki, przy czym każdorazowo wyciągała prawidłowe wnioski i planowała dalsze eksperymenty.

Zamieszczone powyżej drobne uwagi nie mają wpływu na moją bardzo wysoką, pozytywną ocenę całości rozprawy, a także na bardzo wysokie kwalifikacje Doktorantki jako młodego naukowca. W rozprawie doktorskiej mgr farm. Agnieszki Kozak za szczególne osiągnięcia należy uznać:

- opracowanie składu nowego preparatu farmaceutycznego w postaci tabletki zawierającego formy polimorficzne kokryształów etenzamidu z kwasem gentyzynowym o lepszej rozpuszczalności niż sam etenzamid będące podstawą zgłoszenia patentowego;
- otrzymanie i pełna charakterystyka 3 nowych kokryształów etenzamidu z kwasami dikarboksyłowymi o lepszej rozpuszczalności niż sam etenzamid;
- wykazanie, że pod wpływem szybkiego wirowania pod kątem magicznym w trakcie wykonywania eksperymentów NMR w ciele stałym możliwa jest obserwacja *in situ* ewentualnych zmian w strukturze badanej próbki;
- współautorstwo w dwóch pracach o charakterze przeglądowym pokazujące wyśmienite rozeznanie w tematyce kokryształów farmaceutycznych oraz metod ich badania.

Na koniec warto wspomnieć o dorobku naukowym mgr farm. Agnieszki Kozak. Oprócz 5 publikacji wchodzących w skład cyklu o imponującym sumarycznym wskaźniku oddziaływania $IF = 24,710$ Doktorantka prezentowała wyniki swoich badań na 3 konferencjach o zasięgu międzynarodowym i 10 krajowych. Jak wspomniałam wyżej jest współautorką zgłoszenia



Wydział Chemiczny

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

patentowego, a także laureatką 3 nagród Rektora WUM i nagrody za poster podczas konferencji doktorantów. Kierowała grantem Młodego Badacza WUM oraz była laureatką Stypendium Rektora WUM dla najlepszych doktorantów. Ponadto, brała udział w organizacji 4 konferencji wchodząc w skład ich komitetów organizacyjnych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Agnieszki Kozak (d. Sokal) zatytułowana "Kokryształy etenzamidu - badania strukturalne, fizykochemiczne i farmaceutyczne" spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65 poz. 595 z 2003 r. z późn. zm. – Dz.U. nr 164 poz. 1365 z 2005 r. oraz Dz.U. nr 84 poz. 455 z 2011 r.) i wnoszę o dopuszczenie mgr farm. Agnieszki Kozak do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej dysertacji i znaczący dorobek naukowy Doktorantki, zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Izabela Madura

Izabela Madura