

Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Chmiela  
„Badania rozpuszczalności amorficznych substancji leczniczych w matrycach polimerowych  
z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej”

Za zasadniczy cel rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Chmiela można uznać opracowanie nowej metody pomiaru rekrytalizacji farmakologicznie czynnej substancji z przesyconego roztworu polimerowego dla oszacowania jej stężenia po zakończeniu procesu, już w roztworze nasyconym, a także określenie zmian granicznej wartości rozpuszczalności leku pod wpływem wzrostu ciśnienia. Zagadnienia te są ważne nie tylko jako ciekawy temat badawczy ale również ze względu na możliwość uzyskania amorficznego leku, o najbardziej efektywnym stężeniu w polimerze, znacznie lepiej rozpuszczalnego w organizmie pacjenta niż stosowana forma krystaliczna. W tym kontekście istotne są też przeprowadzone obserwacje dotyczące stabilności termodynamicznej amorficznego układu lek - polimer pod wpływem zmian temperatury i z upływem czasu. Wyniki uzyskane przez pana mgr Krzysztofa Chmiela mają zasadnicze znaczenie zarówno dla badaczy glassformerów jak i dla środowiska farmaceutów oraz potencjalnych pacjentów, zainteresowanych otrzymaniem skutecznej, ale jak najmniejszej dawki leku, aby zminimalizować tzw. efekty uboczne terapii.

Praca doktorska pana mgr Krzysztofa Chmiela przedstawiona jest jako cykl trzech artykułów A1, A2 i A3, które są spójne tematycznie i dotyczą substancji zwanej flutamidem (FL). Powstały w okresie od maja 2017 r. do sierpnia 2019 r. i zostały opublikowane w *Molecular pharmaceuticals* (IF = 4.556) oraz *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* (IF = 4.708). Prace są wieloautorskie (odpowiednio 6-, 4- i 3-autorskie). We wszystkich mgr Krzysztof Chmiel jest pierwszym autorem i autorem do korespondencji. Współautorami są członkowie grupy badawczej kierowanej przez pana profesora Mariana Palucha, promotora pracy doktorskiej, przygotowanej na Uniwersytecie Śląskim. Promotorem pomocniczym jest pani dr inż. Justyna Knapik-Kowalczyk. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były finansowane z Narodowego Centrum Badań (udział w projekcie Symfonia 3). Rozdział 1 pracy doktorskiej stanowi ciekawie napisany Wstęp, zakończony listą 16 prac, w których pan mgr K. Chmiel jest współautorem, a które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej oraz listą 7 prezentacji uzyskanych wyników na konferencjach międzynarodowych - niestety zostały wymienione jedynie nazwy konferencji a brak tytułów referatów. Trzy paragrafy Rozdziału 2 są krótkim omówieniem artykułów A1-A3. Rozdział 3 to kopie tych publikacji wraz z oświadczeniami mgr Krzysztofa Chmiela o jego wkładzie pracy do poszczególnych publikacji oraz oświadczeniami promotora i promotora pomocniczego o nadzorowaniu prowadzonych analiz i dyskusowaniu wyników, a także o korekcie manuskryptów przez promotora. Rola 3-ech pozostałych współautorów polegała na wykonaniu pomiarów XRD (K.Jurkiewicz) i dyskusji wyników (W.Sawicki i R.Jachowicz). Rozdział 5 przedstawia bardzo krótkie Podsumowanie otrzymanych rezultatów, a Rozdział 6 zawiera Bibliografię, którą stanowi 50 pozycji literaturowych, w tym 8 przedstawiających wyniki grupy profesora Palucha. W Rozdziale 2 przedstawiono jasno najważniejsze aspekty nieizotermicznego oraz izotermicznego procesu krystalizacji FL w polimerowym roztworze w oparciu o obserwacje metodą spektroskopii dielektrycznej, również dla ciśnienia 20 MPa i 50 MPa. Omówienie wyników, bardzo lakoniczne (8 stron), jest ciekawe w czytaniu i napisane dobrym językiem choć wyraźnie brakuje szerszego kontekstu poruszanych problemów a także ilustracji finalnych rezultatów pracy - autor powołuje się na rysunki z publikacji A1-A3.

Wyraźnie brak rysunku ze schematem budowy chemicznej molekuly flutamidu oraz informacji o składowych momentu dipolowego molekuly. Na pewno niedosyt pozostawia jednostronnicowe Podsumowanie bo prace dotyczą aktualnego zagadnienia a wyniki są ciekawe, opublikowane w dobrych czasopismach w oparciu o bogaty materiał doświadczalny. Niemniej wydaje się, że praca doktorska mgr Krzysztofa Chmiela jest dobrym przewodnikiem zachęcającym do szczegółowej lektury samych publikacji.

Wiele syntetyzowanych farmaceutyków to substancje organiczne łatwo ulegające zeszkleniu ale stosowane w leczeniu w formie krystalicznej ze względu na jej stabilność termodynamiczną. Dla flutamidu, którego własnościami fizykochemicznymi zainteresował się mgr Krzysztof Chmiel, zarówno biodostępność jak i rozpuszczalność w wodzie formy krystalicznej są niskie, co narzuca duże dawki, gdyż jedynie 50% leku jest wchłaniane w organizmie pacjenta. Stwierdzono równocześnie, że amorficzny flutamid podgrzany do temperatury pokojowej ulega pełnej krystalizacji już po 150 minutach, a więc jego stabilność jest niewielka. Naturalną strategią w badaniach nad lekami jest poszukiwanie takiej amorficznej formy leku w matrycy, aby przy optymalnej zawartości aktywnego leczniczo składnika nie ulegała ona rekrystalizacji, czyli była stabilna w warunkach określanych przez normy farmaceutyczne. W pracy doktorskiej badania podjęto dla amorficznego układu lek – polimer o zmienianej zawartości składników, tak aby wykryć jaki skład zapewnia optymalną stabilność i działanie terapeutyczne. Odpowiedź na pytanie kierowane do fizyka o to przy jakiej zawartości rozpuszczanego leku, proces rekrystalizacji będzie wyeliminowany była dotąd formułowana na bazie żmudnych obserwacji kalorymetrycznych. W pracy A1 pokazano po raz pierwszy, że oszacowanie granicznej rozpuszczalności leku w polimerze można uzyskać prościej poprzez zastosowanie spektroskopii dielektrycznej. W trakcie obserwacji zmian dynamiki przy ogrzewaniu dla wyjściowego układzie FL + 12.5% wagowych polimeru PVP/VA, stwierdzono najpierw zanikanie relaksacji strukturalnej, co odzwierciedlało proces rekrystalizacji części FL. W amorficznej reszcie próbki o większym stężeniu polimeru przy dalszym ogrzewaniu nie obserwowano już procesu krystalizacji a przy ochładzaniu przejście szkliste następowało w temperaturze znacznie wyższej. Ciekawą obserwacją było stwierdzenie w takim układzie procesu relaksacyjnego o innych parametrach co przypisano przejściu z roztworu przesyconego flutamidem (o proporcjach lek – polimer 5:1) w roztwór nasycony (o proporcjach 1:1). Ten sam stan roztworu nasyconego o dobrej stabilności uzyskiwano również w roztworach znacznie bardziej przesyconych właśnie dzięki krystalizacji nadmiaru FL podczas ogrzewania. Graniczne stężenie FL w roztworze FL + PVP/VA ustalono na 59 %. Amorficzne własności fizyczne, wartość  $T_g$  i obraz relaksacyjny dla nowo sporządzonego roztworu o takim składzie zostały potwierdzone, a w trakcie czteroletnich obserwacji rentgenowskich nie stwierdzono w nim oznak krystalizacji. Badania pokazały, że układ lek – polimer jest stabilny, gdy jest w nim odpowiednia proporcja składników i układ jest w danej temperaturze roztworem nasyconym. W badaniach roztworów o różnym stężeniu wykazano, że wraz ze wzrostem udziału polimeru rośnie temperatura przejścia szklistego, a także krystalizacji, która zanika zawsze gdy proporcje FL i polimeru PVP/VA w próbce są 59% : 41%. Można też zauważyć, że od stężenia FL w układzie FL – polimer zależy tempo reorientacji molekuł FL - im mniej polimeru PVP/VA w próbce tym ruchy FL są szybsze (z porównania wyników na Fig.6a (dla 5:1  $T_g = 280$  K zaś dla 1:1  $T_g = 317$  K) oraz na Fig.9b (10:1,  $T_g = 273$  K)).

W pracy A2 przedstawiono wyniki badań z udziałem polimerów PVP oraz PVAc proponowanych jako stabilizatory dla amorficznego układu FL - polimer. Bardzo ciekawym rezultatem jest wykrycie, że tym mniejsze jest stężenie polimeru potrzebne do uzyskania roztworu nasyconego im większa wartość jego temperatury zeszklenia (bogaty w wyniki

rysunek Fig.9 w pracy A2). Tym samym najlepszym stabilizatorem układu FL-polimer okazał się polimer PVP, gdyż eliminację krystalizacji zapewnia jego 29% udział w roztworze. Nieco słabszy efekt stabilizujący amorficzny układ wykazuje PVP/VA, (potrzeba 41%). Natomiast dla PVAc pożądany efekt wymaga aż 65% polimeru w roztworze. Ważne jest stwierdzenie, że zależność temperatury przejścia szklistego od stężenia polimeru spełnia równanie Gordona-Tylora/ Kelly-Bueche jedynie dla PVP/VA oraz PVAc. Natomiast w przypadku PVP zaobserwowano wyraźne odchylenia od liniowej zależności, co wskazuje na silniejsze oddziaływania molekuł polimeru z FL, podobnie jak w roztworach z kilkoma innymi lekami. Problem jak to koreluje z faktem, że PVP (o najwyższej wartości  $T_g$ ) jest najlepszy jeśli chodzi o eliminację rekrystalizacji FL z roztworu pozostaje do zbadania.

Znaną wieloletnią specjalnością grupy badawczej promotora pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Chmiela są badania dielektryczne przy wysokich ciśnieniach, szczególnie dla układów molekularnych łatwo tworzących szkło. Problem wpływu ciśnienia na własności fizyczne jest rozpatrywany dla wielu związków takich jak izotropowe i anizotropowe fazy typu van der Waalsa, ciecze jonowe, układy z silnym wiązaniem wodorowym również w matrycach czy polimery. W pracy A3 zamiarem autorów jest odpowiedź na pytanie w jaki sposób wysokie ciśnienie zmienia rozpuszczalność graniczną flutamidu w roztworze PVP/VA. Próbkami wyjściowymi było kilka mieszanin o stężeniu od 13 % do 55 % wagowych polimeru. Ponieważ efekt wpływu ciśnienia na proces rekrystalizacji nie jest uniwersalny – wzrost upakowania molekuł może powodować poprawę stabilności amorficznego układu ale może też zwiększać tendencje do zarodkowania fazy krystalicznej - tym ciekawsze są wyniki uzyskane dla FL w PVP/VA, które pokazują, że pod wyższym ciśnieniem stabilny roztwór polimerowy uzyskujemy przy mniejszej dawce leku. Pomiar izotermiczne rekrystalizacji pokazały, że wzrost ciśnienia zmniejsza wartość graniczną rozpuszczalności FL co sprawdzono dla kilku ustalonych temperatur. Na przykład przy najniższej temperaturze obserwacji (343 K) wzrost ciśnienia do 50 MPa powoduje, że udział procentowy FL w stabilnym roztworze nasyconym maleje z 59 % do 54 %. Również przy wysokim ciśnieniu potwierdzono fakt, że podwyższaniu temperatury obserwacji towarzyszy wzrost granicznej wartości stężenia FL (przy 50 MPa z 54 % dla 343 K do 57% dla 363 K).

Za najważniejsze osiągnięcia mgr Krzysztofa Chmiela, przedstawione w recenzowanej przez mnie pracy doktorskiej, uważam:

1/ Wybór do badań ciekawej substancji farmaceutycznej tworzącej szkło i ulegającej zimnej krystalizacji.

2/ Przebadanie złożonej dynamiki flutamidu pod normalnym oraz podwyższonym ciśnieniem.

3/ Zaproponowanie spektroskopii dielektrycznej jako metody wyznaczania granicznej rozpuszczalności leku w matrycy polimerowej, a także otrzymanie stabilnej formy amorficznej o optymalnym składzie do zastosowań farmakologicznych.

4/ Wyznaczenie metodą spektroskopii dielektrycznej wpływu ciśnienia na rozpuszczalność leku w polimerowej matrycy oraz na temperaturę zeszklenia układu amorficznego uzyskanego po izotermicznej krystalizacji.

Z obowiązku recenzenta zebrałam poniżej pewne nieścisłości i błędne sformułowania, na które natrafiłam podczas lektury pracy doktorskiej. Na przykład zamiast „wyznaczenie maksimum procesów .....ich kształt” powinno być „...wyznaczenie maksimum krzywych strat dielektrycznych i ich kształtu”. Zauważyłam też uchybienia w tekście publikacji A1: we wstępie brak jest objaśnienia skrótu „API”, zaś w abstrakcie „API-polymer system”. We wzorze 1 parametr  $\epsilon_0$ , przenikalność w próżni, nie występuje a jest w objaśnieniu, tymczasem nie jest napisane co oznacza „dielectric strength”, użyte we wzorze. W tekście pracy używane

jest określenie „molecular mobility” jako wielkość odpowiedzialna za relaksację dielektryczną a zjawisko to jest uwarunkowane zmianami rzutu momentu dipolowego molekuly ma kierunek pola mierzącego czyli ruchami reorientacyjnymi. W podpisie do Fig.8 zamiast „red circle” powinno być red star. W podpisie rysunku Fig.11 brak oznaczeń dla ilustracji a i c, zaś przy (b) napisano, że straty dielektryczne są obserwowane przed krystalizacją a roztwór o stężeniu 1:1 jest nasycony i krystalizacja nie następuje. W podpisie pod Fig.12 napisano o trzech różnych obserwacjach a na rysunku jest ilustracja tylko dwóch wyników. W pracy A2 napis na rysunku Fig.8 mówi o 15% udziale PVP w roztworze a dane są dla 7% udziału PVP w próbce tak jak napisano w podpisie i w tekście pracy. W pracy A3 zamiast znaku równości „ $p = 1/T$ ” powinien być znak proporcjonalności. Ponadto w podpisach pod rysunkami Fig.5 i Fig.6 zamiast „royal lines” powinno być royal blue lines.

Na zakończenie chciałam podkreślić, że w pracy doktorskiej otrzymano bardzo ciekawe wyniki, istotne zarówno z punktu widzenia badań fundamentalnych jak i zastosowań farmaceutycznych. Część rezultatów ma charakter pionierski. Do oceny granicznej rozpuszczalności leku w polimerze zaproponowano metodę, którą wyróżnia szereg atutów takich jak łatwe wyznaczanie temperatury przejścia szklanego oraz możliwość zarówno obserwacji krystalizacji w czasie rzeczywistym jak i porównania stabilizującego działania różnych polimerów. Spektroskopia dielektryczna dostarcza też bezpośrednio informacji o dynamice dipolowych molekuł leku i jej zmianach z temperaturą i ciśnieniem. Mgr Krzysztof Chmiel świetnie przedstawił zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej na Seminarium Oddziału Fizyki Materii Skondensowanej Instytutu Fizyki Jądrowej PAN.

Uważam, że przesłana do recenzji rozprawa czyni zadość wymogom stawianym pracom doktorskim i kieruję wniosek do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Krzysztofa Chmiela do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie jestem przekonana, że rezultaty pracy zasługują na jej wyróżnienie

*M. Massalska-Arodz*

Prof. dr hab. Maria Massalska-Arodz

Kraków, 8 IX 2020