



dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni
Katedra i Zakład Technologii Postaci leku
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a; 50-556 Wrocław
tel. (71) 784 03 24, faks (71) 784 03 17
bozena.karolewicz@umw.edu.pl

Wrocław, 10 września 2022 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Mariusza Staśkiewicza
pt. „*Assessment of Potential Impact of Cherry Flavor on Stability of Montelukast Tablets*”

wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. n. farm. Pawła Szymańskiego i promotora pomocniczego dr n. farm. Kamili Czarneckiej – w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Na jakość produktu leczniczego mogą mieć istotny wpływ zanieczyszczenia powstałe w wyniku procesu wytwarzania czy pochodzące od składowych formułacji. Zanieczyszczenia zarówno substancji leczniczych i produktów leczniczych stanowią dla wytwórców i organów nadzoru nad wytwarzaniem istotny problem i podlegają ścisłej kontroli i bieżącej analizie. W pełni uzasadnione jest oczekiwanie wiarygodnych danych pokazujących, iż produkt zawiera właściwą substancję aktywną, właściwą dawkę, danych pokazujących, iż produkt nie zawiera niedopuszczalnych limitów zanieczyszczeń czy nieznanymi lub niescharakteryzowanymi zanieczyszczeniami, i finalnie jest stabilny w zatwierdzonym okresie trwałości.

W tym kontekście mgr Mariusz Staśkiewicz, w swojej rozprawie na stopień doktora nauk farmaceutycznych, zajął się analizą wpływu składu formułacji tabletek do żucia z montelukastem, w szczególności zastosowanej substancji pomocniczej, aromatu wiśniowego, na zauważony problem pojawiania się zanieczyszczeń w trakcie życia produktu. Podejście do problemu mechanizmu powstawania zanieczyszczeń, ich analizy i redukcji poziomu jest niezwykle aktualnym zagadnieniem dla opracowania wysokiej jakości formułacji produktów leczniczych.

Metodyka badawcza (założenia, cel, metody)

Celem pracy było zbadanie i w razie potrzeby zaproponowanie modyfikacji składu najmniej stabilnej formułacji tabletek do żucia z montelukastem bez dodatku EDTA, produkowanej przez Adamed Pharma dla zmniejszenia szybkości rozkładu i końcowego

stężenia zanieczyszczeń sulfotlenkowych mierzonych w koniec okresu przydatności produktu.

Etapy realizacji celu obejmowały:

- analizę składu formulacji tabletek i identyfikację substancji pomocniczych o potencjale przeciwutleniającym: EDTA, czerwieni tlenku żelaza, Fe_2O_3 , stosowanego aromatu wiśniowego, finalnie wskazanie aromatu wiśniowego jako substancji stabilizującej,
- ocenę analityczną aromatu wiśniowego pod kątem obecnych flawonoidów, kolejno oznaczanie całkowitej zawartości fenoli, całkowitej zawartości flawonoidów i zdolności antyoksydacyjnej aromatu wiśniowego,
- ocenę stabilności w $40^\circ C/75\% RH$ mieszanin placebo i API zawierających 3 różne przeciwutleniacze tj. aromat wiśniowy, kwercetynę i kwas askorbinowy,
- ocenę *in-situ* potencjalnej degradacji montelukastu do zanieczyszczeń sulfotlenkami podczas przygotowywania próbki do analitycznego badania RS,
- ocenę kompatybilności substancji pomocniczych z wykorzystaniem mieszanin API, celulozy mikrokrystalicznej i różnych ilości aromatu wiśniowego,
- ocenę stabilności w warunkach przyspieszonych przez okres 6 miesięcy i w warunkach normalnych przez okres 24 miesięcy formulacji tabletek otrzymanych bez aromatu wiśniowego, zawierających aromat wiśniowy w ilości 100% i 200% w stosunku do oryginalnej receptury wraz z oceną zawartości wody i wpływu na jej wyniki.

W metodologii prowadzonych badań Doktorant wykorzystał techniki analityczne: HPLC-MS (identyfikacja flawonoidów w aromacie wiśniowym), HPLC z detekcją UV (oznaczanie flawonoidów w aromacie wiśniowym, oznaczanie montelukastu i zanieczyszczeń), metody UV-VIS (oznaczanie całkowitej zawartości fenoli, całkowitej zawartości flawonoidów i zdolności antyoksydacyjnej aromatu wiśniowego), metodę oznaczenia zawartości wody Karla Fischera i wilgotności zgodnie z Ph. Eur.

Zastosowane metody zostały prawidłowo dobrane, zapewniając poprawną realizację i ocenę zakładanych celów.

Struktura rozprawy

Praca obejmuje ogółem 85 stron i posiada przyjęty dla prac doktorskich układ, włączając piśmiennictwo, spis rycin, tabel, wykaz skrótów, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wyłączając spis treści. Rozprawa podzielona jest na 14 rozdziałów, w tym wstęp i 2 rozdziały stanowiące 22-stronicowe obszernie wprowadzenie do zagadnień analizowanych w dysertacji. Kolejno rozdziały 4-14 opisują: cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, podsumowanie, piśmiennictwo (sumarycznie 55 stron, około 65% całości

pracy), spis tabel i rycin oraz wspomniane streszczenia w dwóch wersjach językowych. Zaprezentowany materiał został zilustrowany 29 rycinami oraz 34 tabelami.

Wykorzystane piśmiennictwo

Autor przytoczył wykaz 77 pozycji piśmiennictwa, na które się powołuje, obejmujących publikacje naukowe (72 pozycji, ponad 93% cytowanego w pracy piśmiennictwa), publikacje książkowe (5 pozycji), odzwierciedlające na dzień dzisiejszy stan wiedzy z zakresu poruszanego w dysertacji zagadnienia. W części teoretycznej obejmującej wstęp i 2 rozdziały Doktorant przeprowadził szczegółową analizę źródeł, przytaczając 72 pozycje piśmiennictwa. Piśmiennictwo dotyczące podejmowanej tematyki stanowi staranny wyciąg cytowanego piśmiennictwa z obszaru tematyki pracy, i potwierdza przygotowanie Doktoranta do analizy realizowanego problemu badawczego. Należnej uwagi wymaga jedynie forma cytowania niektórych prac (patrz. pozycja 1 brak numeru czasopisma i stron itp., pozycja 31 rok 2010 a nie 210, czy zamiennie cytowanie pełnych nazw czy skrótów czasopism, czy błędy poz. 70, itp.)

Szczegółowa ocena merytoryczna poszczególnych części rozprawy

Rozdział 1. stanowiący wstęp do recenzowanej dysertacji doktorskiej wprowadza czytającego w zagadnienie stabilności montelukastu związane z utlenianiem substancji czynnej do zanieczyszczeń sulfotlenkami, w tym powstawania dwóch enancjomerów zanieczyszczeń sulfotlenkowych, których zawartość ze względu na brak specyficzności metody analitycznej jest określana jako suma obu enancjomerów. Omówione zostały również główne produkty utleniania montelukastu oraz wykazane na podstawie badań stabilności 3 produktów leczniczych firmy Adamed Pharma zagadnienie różnic w profilu zanieczyszczeń i szybkości degradacji, wyrażone jako stężenie zanieczyszczeń sulfotlenkami. Rozdział 2. charakteryzuje syntetycznie drogę degradacji i mechanizm powstawania zanieczyszczeń sulfotlenkami substancji leczniczych zaliczanych do siarczków tj. m.in. montelukast, co można wykorzystać w podejściu do doboru substancji pomocniczych w pracach projektowych i rozwojowych formulacji oraz w planowanym procesie analizy próbek substancji i formulacji.

W rozdziale 3. Właściwości przeciwutleniające i prooksydacyjne fenolików Doktorant charakteryzuje fenoliki tj. np. pochodne kwasu benzoowego, czy cynamonowego oraz grupę flawonoidów, opisując ich strukturę oraz mechanizmy wielokierunkowego działania przeciwutleniającego m.in. usuwanie reaktywnych form tlenu (ROS), aktywację enzymów antyoksydacyjnych, aktywność chelatująca metale, hamowanie oksydaz, łagodzenie stresu

oksydacyjnego wywołanego tlenkiem azotu itd. W podrozdziale 3.4. Doktorant wspomina o aktywności prooksydacyjnej flawonoidów w procesie utleniania poprzez rodniki fenoksyłowe. Opisane zagadnienie jest istotne dla poruszanego w części badawczej wpływu aromatu wiśniowego, substancji pomocniczej w analizowanych formułacjach produktów z montelukastem, zawierającej jako składowe właśnie związki z grupy flawonoidów. Część teoretyczną dysertacji podsumowują rozdziały odnośnie dwóch mechanizmów zapobiegania utlenianiu montelukastu do zanieczyszczenia sulfotlenkami z wykorzystaniem związków polifenolowych tj.: zmiatania wolnych rodników i chelatowania jonów metali oraz rozdziały odnoszące się do metod oznaczania całkowitej zawartości fenoli, całkowitej zawartości flawonoidów, zdolności antyoksydacyjnej.

W następnym rozdziale 4. po teoretycznym wprowadzeniu Doktorant wskazuje na główne cele badawcze pracy. W kolejnym 5. rozdziale zostały wymienione materiały, opisane metody badań z wykorzystaniem aparatury badawczej.

Rozdział 6. przedstawia wyniki badań i dyskusję. W podrozdziale 6.1. przedstawiono wyniki analitycznej identyfikacji flawonoidów w 2 partiach aromatu wiśniowego początkowo w wykorzystaniem metody HPLC, i kolejno ich weryfikację przy użyciu techniki HPLC-MS. Napotkane problemy techniczne tj. brak jonizacji niektórych składników, brak wzorców widm w bazach danych dla składników, dla których nie zaobserwowano jonizacji, czy wiele pików dla niskich mas cząsteczkowych poszukiwanych cząsteczek, nie pozwoliły na identyfikację składników mieszaniny próbnej i nie wskazały na obecność flawonoidów w próbkach aromatów. W kolejnej części rozdziału przedstawiono wyniki oceny całkowitej zawartości fenoli w aromacie wiśniowym, które to zgodnie ze stawianą przez Autora hipotezą, są prawdopodobnie odpowiedzialne za jego właściwości antyoksydacyjne, co potwierdzono w oznaczeniu potencjału antyoksydacyjnego aromatu wiśniowego w 3 rozcieńczeniach w teście zdolności antyoksydacyjnej. W podrozdziale 6.2. Doktorant oceniał, jak aromat wiśniowy i inne stosowane przeciwutleniacze tj. kwercetyna i kwas askorbinowy wpływają na właściwości przeciwutleniające fizycznych mieszanin z montelukastem i mieszanin placebo zawierających wszystkie składniki bazowej formułacji tabletek, analizując względne stężenia zanieczyszczenia sulfotlenkowego po 30 dniach badania stabilności. Pomimo, że w badaniach żaden z użytych przeciwutleniaczy nie spowalniał znacząco tempa powstawania zanieczyszczeń sulfotlenkami, Doktorant postawił hipotezę, iż obserwowany rozkład do zanieczyszczeń sulfotlenkami może nie zachodzić w mieszaninie proszku, ale jest wyzwalany podczas przygotowania próbki i ma miejsce w roztworze, co dalej poddał weryfikacji. Mgr Mariusz Staśkiewicz potwierdził stabilność próbek w roztworze i kolejno analizował istnienie

ryzyka powodowanej przez przeciwutleniacze niepożądaną odwróconą konwersji MTK2 (trans diastereoizomer sulfotlenku) z powrotem do montelukastu lub rozkładu innego zanieczyszczenia, co może potencjalnie prowadzić do fałszywego poziomu zanieczyszczenia sulfotlenkami podczas badania. Zastosowanie któregośkolwiek z przeciwutleniaczy nie prowadziło do zmniejszenia stężenia zanieczyszczeń sulfotlenkami w porównaniu z próbką referencyjną. W kolejnym podrozdziale 6.3. pracy w warunkach przyspieszonych (40°C, 75% RH) oceniano zgodność soli sodowej montelukastu ze wszystkimi substancjami pomocniczymi badanej formulacji tabletek, identyfikując na podstawie oznaczeń substancje mogące mieć istotny wpływ na powstawanie zanieczyszczeń sulfotlenkami, tj. aromat wiśniowy i celulozę mikrokrystaliczną. Stwierdzono, iż niewielka ilość aromatu wiśniowego znacznie zmniejsza tempo powstawania zanieczyszczeń MTK2, dodatkowo zarówno jakość aromatu wiśniowego, jak i celulozy mogą mieć istotny wpływ na powstawanie zanieczyszczeń sulfotlenkami. Jakość tę można potencjalnie zweryfikować na podstawie całkowitej zawartości fenoli lub zdolności antyoksydacyjnej testowanej zgodnie z przedstawionymi badaniami. Ostatni podrozdział 6.3. stanowi ocenę stabilności substancji leczniczej i zarejestrowanej formulacji tabletek zawierających różne ilości aromatu wiśniowego (100 i 200% oryginalnej receptury) o udokumentowanych w pracy właściwościach antyoksydacyjnych. W warunkach przyspieszonych nie obserwowano zmian dotyczących stężenia zanieczyszczeń sulfotlenkowych w badanych tabletkach montelukastu bez aromatu wiśniowego i zawierającej 100% aromatu, jedynie w przypadku próbki zawierającej 200% oryginalnej zawartości aromatu wykazano niższe stężenie MTK2 po sześciu miesiącach. Na nie stwierdzono istotnego wpływu wody resztkowej i wilgotności na stabilność tabletek po 12 miesiącach (25°C/60% RH).

Rozdział 7. zawiera autorskie podsumowanie badań wraz z wnioskami i odniesieniami do bieżącego piśmiennictwa światowego. Doktorant wskazuje na przyczyny tworzenia sulfotlenków montelukastu podczas jego przechowywania: 1) niezgodność API-celuloza mikrokrystaliczna, 2) sulfoksydację spowodowaną przez inne wolne rodniki utworzone w matrycy tabletki podczas przechowywania leku. Na podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście do tematu, skutkujące w efekcie rozwiązaniem problemu badawczego.

Rozdziały kolejno 8, 9, 10, 11, 12, 13 i 14 stanowią piśmiennictwo, spis tabel, rycin, skrótów, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz informację o publikacji obejmującej wyniki badań.

Po lekturze rozprawy, w mojej ocenie wskazane cele rozprawy zostały osiągnięte i podsumowane przez Doktoranta.

Język i formalna strona rozprawy

W przedłożonej w języku angielskim rozprawie doktorskiej brak konsekwencji w stosowaniu zasad dla odsyłaczy bibliograficznych, Doktorant dowolnie stosuje skróty bądź pełne nazwy czasopism, na które się powołuje, o czym już wspomniano w części dotyczącej wykorzystanego piśmiennictwa. Warto byłoby w pracy zacytować również Ph. Eur. jako źródło, skoro Doktorant się na nie powołuje. W dysertacji znaleziono nieliczne błędy tj. omyłkę w nazwie serii aromatu wiśniowego znaleziono na stronie 38 w tabeli, dodatkowo pod tabelą 6-6 dla jasności wskazane byłoby umieszczenie rozwinięcia skrótów tj. MOK, styren, keto. Jakość przedłożonej dysertacji świadczy o gruntownej analizie i korekcie tekstu.

Inne osiągnięcia Doktoranta:

Całkowita liczba publikacji Doktoranta w czasopismach z Listy Filadelfijskiej - wynosi 2 o łącznym współczynniku wpływu **IF=2,696**, w tym:

1. Publikacja jako podstawa rozprawy: „Evaluation of the potential impact of cherry flavour on the stability of montelukast tablets”, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* (2022), IF=0,555; 100 pkt. MNiSW (pierwszy autor)
2. „New hybrids of tacrine and indomethacin as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors”, *Chemical Papers* (2021), <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01295-y>, IF= 2,146; 40 pkt. MNiSW (współautor).

Biorąc pod uwagę wysoką jakość merytoryczną pracy i nieliczne błędy edytorskie chciałabym przedstawić do dyskusji w toku obrony następujące zagadnienia:

1. Dlaczego Doktorant wybrał do badań stabilności serię aromatu wiśniowego (12054770) o niższej całkowitej zawartości związków fenolowych wyrażonych jako ekwiwalent kwasu galusowego (GAE)?
2. Czy w toku analizy piśmiennictwa czy doświadczeń własnych Doktorant znalazł przykłady wskazania na wzrost poziomu zanieczyszczeń w kontekście właściwości utleniających celulozy mikrokryształicznej jako składowej formulacji?

Wymienione do dyskusji kwestie w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej do oceny dysertacji, a jedynie wynikają z zainteresowania tematem i stanowią zagadnienia do rozważenia w kolejnych badaniach nad projektowaniem i oceną formulacji farmaceutycznych.

Wnioski i konkluzja końcowa

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- istotność i aktualność wybranej tematyki, w tym wypełnienie luki poznawczej w ocenie formulacji farmaceutycznych z substancjami pomocniczymi o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających z APIs zaliczanymi do siarczków tj. np. produkty z montelukastem,
- wskazanie i analizę wpływu składowych formulacji na powstawanie zanieczyszczeń sulfotlenkowych;
- wskazanie aromatu wiśniowego jako wielofunkcyjnej substancji pomocniczej, która oprócz funkcji maskowania smaku formulacji wpływa na proporcję powstawania zanieczyszczeń sulfotlenkowych i może być z powodzeniem wykorzystana do modyfikacji obecnych preparatów w celu zmniejszenia końcowego stężenia tych zanieczyszczeń na końcu okresu trwałości produktu,
- znaczenie podjętych badań dla wyboru i kwalifikacji dostawców substancji pomocniczych,
- wskazanie na podejście do badań formulacyjnych z APIs zaliczanymi do siarczków podatnymi na utlenianie, wymagające dodatkowej oceny podczas badań kontroli jakości.

Reasumując oceniana rozprawa doktorska mgr Mariusza Staśkiewicza stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zagadnienie poszukiwania rozwiązań w zakresie opracowania wysokiej jakości formulacji produktów leczniczych. Analizowane w dysertacji problemy badawcze są istotne i aktualne. Na podkreślenie zasługuje znaczenie uzyskanych wyników badań dla rozwoju prac badawczych ukierunkowanych na rozwój postaci leku, w tym doboru składowych formulacji, poznania mechanizmu powstawania zanieczyszczeń, ich analizy i podejmowanych działań w celu redukcji ich poziomu, co jest niezwykle aktualnym zagadnieniem dla technologów, wytwórców i organów nadzoru nad wytwarzaniem. W mojej opinii praca wychodzi naprzeciw stawianym oczekiwaniom, iż opracowanie i ocena formulacji w toku prac badawczych, stanowią istotny wkład w planowanie i rozwój formulacji produktów leczniczych z substancjami zaliczanymi do siarczków, mając na względzie jakość produktu i bezpieczeństwo pacjenta. Wiedza na temat właściwości formulacji, raz zidentyfikowana i potwierdzona, może być z powodzeniem wykorzystana do modyfikacji obecnych preparatów w celu zmniejszenia identyfikowanych zanieczyszczeń na końcu okresu trwałości produktu.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule

w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana Mgr Mariusza Staśkiewicza do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Jednocześnie korzystając z przysługującego recenzentowi prawa wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA KAKŁAD
TECHNOLOGII POSTACI LEKU
Kierownik

dr hab. Bożena Karłowicz, prof. uczelni