



Bydgoszcz 04.04.2025 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Cebulskiej

„Opracowanie czułych metod oznaczania substancji czynnych  
i substancji pokrewnych w produktach leczniczych niskodawkowych  
z wykorzystaniem wysokosprawnej i ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej  
(HPLC/UPLC)”

wykonanej pod kierunkiem promotora Pana prof. dr hab. n. farm. Pawła Szymańskiego z  
Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Wydziału  
Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Jednym z elementów działalności uczelni jest aktywne wpieranie w zakresie transferu wiedzy i technologii z nauki do różnych sektorów gospodarki. Jest to bardzo ważny element współpracy, który jest niezwykle istotny dla obydwu stron: jednostek naukowych oraz różnych podmiotów gospodarczych.

Przykładem takiej współpracy jest powyższa rozprawa doktorska zrealizowana w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat wdrożeniowy” wspólnie z Zakładem Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Oddziałem Badań i Rozwoju Zakładów Farmaceutycznych Polpharma S.A.

Praca doktorska została przygotowana w formie pracy wdrożeniowej co jest zgodne z art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. Praca dotyczy opracowania i walidacji metod analitycznych do oceny zawartości atropiny, jej produktów degradacji oraz substancji pokrewnych dla niskodawkowego produktu leczniczego o nowym zastosowaniu terapeutycznym. Opisane procedury są jednymi z etapów niezbędnymi do dokumentacji technicznej składanej do URPL podczas dopuszczenia do obrotu produktu leczniczego.

Cel pracy został jasno sprecyzowany i jest nim opracowanie i walidacja metody oznaczania zawartości [REDAKTOWANE] i substancji pokrewnych oraz produktów degradacji w opracowywanych formulacjach - [REDAKTOWANE]. Opracowana metoda będzie wykorzystana podczas rozwoju produktu leczniczego – [REDAKTOWANE]

██████████ badań stabilności oraz podczas rutynowych analiz w celu kontroli jakości produktu leczniczego.

Praca składa się z 186 stron poprzedzonych wykazem stosowanych skrótów. Wstęp obejmuje zagadnienia opisujące grupę ██████████ ██████████ ██████████, metody chromatograficzne oraz metodologię kontroli jakości produktów leczniczych. W dalszej części doktorantka znając dane farmakopealne oraz literaturowe dotyczące substancji aktywnej zgodnie z wytycznymi ICH opisała poszczególne etapy ustalania odpowiednich warunków chromatograficznych a następnie ich walidacji.

Analizując etap pracy dotyczący rozwoju metod analitycznych nasuwają się następujące pytania:

- Warunki chromatograficzne zostały zaaplikowane z monografii ██████████ ██████████ z Farmakopei Europejskiej. Jednak mam pytanie odnośnie wybranych elementów metody. Czy stosowanie metody gradientowej szczególnie w przypadku stosowania 30 %v/v acetonitrylu z buforem fosforanowym nie stwarzało problemu dla żywotności kolumny chromatograficznej. Czy objętość nastrzyku 100 µl nie można zredukować do mniejszych objętości?
- Czy do badań rozwojowych wyznaczanie parametru lipofilowości LogP metodą obliczeniową (program ACD/Labs 12.0) jest wystarczające?
- Analiza literaturowa pozwoliła na wykrycie dodatkowego zanieczyszczenia ██████████ ██████████ które jest możliwe w wyniku utleniania w warunkach zasadowych. Doktorantka potwierdziła ten fakt poprzez zastosowanie programu do przewidywania ścieżek degradacji substancji. Zanieczyszczenie ██████████ nie zostało wcześniej określone oraz nie jest specyfikowane w aktualnym wydaniu Farmakopei Europejskiej. Jak na podstawie analizy chromatograficznej opisanej na str 60 (rysunek 5) przedstawiającej kolejność elucji poszczególnych składników analitu udało się zidentyfikować dwa izomery ██████████ ██████████ (pkt 6 i 7 zgodny z czasem elucji)?

W toku rozwoju metody analitycznej wykorzystano ją do oceny przygotowanych formuacji produktów buforowanych w różnym zakresie pH po uprzednim procesie starzenia w warunkach 40°C/75%RH przez 1 miesiąc w celu wygenerowania potencjalnych zanieczyszczeń. Najbardziej stabilną formuacją ██████████ okazał się bufor pH 4,5, który to gwarantował brak degradacji substancji czynnej w badanym okresie. Doktorantka potrafiła wyjaśnić degradację ██████████ o różnym nasileniu w zależności od pH buforu opisując potencjalne reakcje wpływające na ten proces. Zjawisko degradacji API bazując na danych literaturowych oraz wynikach własnych badań opisała w publikacji w czasopiśmie *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* (2024), której jest główną autorką. Pozwoliło to na określenie krytycznych parametrów metody kontroli jakości formuacji. W tym celu dokonała optymalizacji metody chromatograficznej biorąc pod uwagę różny skład fazy ruchomej oraz stacjonarnej. Stawiając sobie również za cel poprawę rozdziału między zanieczyszczeniami (głównie N-tlenki) oraz ogólnej rozdzielczości i czułości metody, przetestowała różne kolumny chromatograficzne pod kątem wypełnienia, zmodyfikowanej wielkości cząstek i rozmiaru kolumny. Finalnie, aby sprostać postawionym celom konieczne było przejście na układ

ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) z zastosowaniem kolumny Poroshell (C18) o wielkości cząstek 1,9  $\mu\text{m}$ .

Metoda została zwalidowana dla produktu leczniczego - [REDACTED] pod kątem sprawności układu chromatograficznego, specyficzności metody, precyzji systemu pomiarowego, precyzji metody, liniowości i dokładności oraz zakresu metody. Był to proces czasochłonny i wymagał od doktorantki dużego doświadczenia analitycznego w obszarze chromatografii cieczowej. Wyniki powyższych analiz potwierdziły spełnienie ustalonych kryteriów akceptacji. Ważną uwagą jest informacja dotycząca odporności metody na zmiany parametrów układu chromatograficznego i stosunków faz ruchomych w wybranym zakresie z zastrzeżeniem, aby ściśle przestrzegać składu fazy ruchomej oraz warunków przechowywania fazy ruchomej ze względu na rozpuszczalność dodecylsiarczanu sodu w fazie ruchomej. Pojawienie się nawet niewielkiej opalescencji może znacząco wpłynąć na sprawność układu chromatograficznego. Uzyskane dane pozwalają na stwierdzenie, że metoda ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej jest odpowiednia do oznaczania zawartości [REDACTED] oraz do potwierdzenia tożsamości API w produkcji.

Ciekawym elementem badań były badania degradacyjne analizowanej substancji czynnej. Potwierdziły one, że proponowana metoda jest odporna na potencjalne produkty rozkładu i nie wpływają one na prawidłową ocenę zawartości [REDACTED] w produkcie. Równolegle z walidacją metody oznaczania zawartości [REDACTED] i substancji pokrewnych prowadzono badania stabilności wytworzonych formułacji. Ostatecznie testowano formułację [REDACTED] w długoterminowych badaniach stabilności. Wyniki potwierdziły stabilność produktu w środowisku o pH ok. 4,5 przez 24 miesiące.

Reasumując zadania zrealizowane przez doktorantkę można jednoznacznie stwierdzić, że zostały one przeprowadzone zgodnie z wytycznymi ICH oraz EMA. Prawidłowe przeprowadzenie procesu walidacji zapewnia wysoką jakość i wiarygodność uzyskanych wyników pomiarowych co z pewnością wpłynie na wysoką jakość i trwałość a w konsekwencji na skuteczność planowanego do wdrożenia produktu leczniczego.

Proces uzyskania pozwolenia na dopuszczenie do obrotu produktu leczniczego podlega rygorystycznym przepisom. Obowiązujące przepisy narzucają producentom spełnienie szeregu wymogów w tym złożenia zuniifikowanego dokumentu technicznego CTD. To właśnie na podstawie tej dokumentacji trzeba udowodnić, że kandydat na produkt leczniczy oprócz skuteczności i bezpieczeństwa spełnia wymagania pod kątem jakościowym i trwałości w kontekście danej formułacji leku. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest właśnie tego dowodem i stanowi istotny element w procesie wdrożenia do produkcji w [REDACTED] dla nowego wskazania terapeutycznego. Przedstawiony materiał ma istotne znaczenie dla Modułu 3 dokumentu CTD opisującego informacje chemiczne i farmaceutyczne substancji czynnych i pomocniczych a przede wszystkim kontroli jakości gwarantującej ich działanie i bezpieczeństwo w określonym czasie stosowania. Objętość zebranego i opisanego materiału w rozprawie doktorskiej świadczy o fakcie jak dużą wagę przypisuje się do procesu wdrożenia nowego leku na rynek farmaceutyczny.

Praca ta znacznie różni się od klasycznych rozpraw przedstawiających oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Niemniej wymagało to od doktorantki jeszcze większej uwagi i umiejętności w zakresie wykonywania prac badawczo-rozwojowych pod kątem ich zastosowania we wdrożeniu produktu leczniczego, co narzucają obowiązujące przepisy i wytyczne ICH oraz Europejskiej Agencji Leków (EMA). Patrząc na poszczególne etapy prac realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej można z całą pewnością stwierdzić, że jej oryginalne rozwiązanie w zakresie analityki farmaceutycznej zgodne z obowiązującymi w tym zakresie przepisami z pewnością stanowią duży wkład w powstanie dokumentacji dołączanej do wniosku o dopuszczenie do obrotu produktu leczniczego.

Zaprezentowana rozprawa doktorska ma charakter pracy wdrożeniowej co jest zgodne z obowiązującą Ustawą Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce i opisuje rozwiązanie problemu analitycznego na jednym z etapów wdrażania produktu leczniczego w [REDACTED]. Prace oceniam pozytywnie i wnoszę o dopuszczenie pani mgr inż. Eweliny Cebulskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Kierownik  
Katedry Chemii Leków  
  
prof. dr hab. Michał Marszałł