

Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Autoreferat

dr n. farm. Tomasz Siódmiak

BYDGOSZCZ 2023

1. Imię i nazwisko

Tomasz Siódmiak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2004-2010 kierunek Farmacja; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Wydział Farmaceutyczny;

2010 Magister Farmacji, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy magisterskiej: „Synteza boronowanej benzylo-waliny o spodziewanej aktywności biologicznej dla terapii BNCT”; promotor: prof. dr hab. Bożena Modzelewska-Banachiewicz;

2013-2014 Menedżer projektu badawczo-rozwojowego – studia podyplomowe dla pracowników naukowych, Wyższa Szkoła Bankowa w Toruniu;

2014 Doktor nauk farmaceutycznych (z wyróżnieniem), Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł rozprawy doktorskiej: „Kinetyczny rozdział (R,S)-ibuprofenu z zastosowaniem lipaz z *Candida rugosa* w formie wolnej oraz immobilizowanej”; promotor: prof. dr hab. Michał Piotr Marszałł;

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2010 – 2015	Asystent, Katedra Chemii Leków; Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
2015 - obecnie	Adiunkt, Katedra Chemii Leków; Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
2021 – obecnie	Adiunkt, Zakład Technologii Postaci Leku; Wydział Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej; Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie;

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Ocena potencjału aplikacyjnego wybranych lipaz w otrzymywaniu enancjomerów leków chiralnych

Osiągnięcie naukowe, stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny opisano w cyklu pięciu oryginalnych, powiązanych tematycznie prac opublikowanych w czasopismach naukowych w latach 2015-2023. W czterech pracach (H_1, H_2, H_4, H_5) jestem pierwszym autorem, w tym w trzech (H_2, H_4, H_5) autorem

korespondencyjnym. W jednej pracy (H_3) jestem drugim autorem i równocześnie autorem korespondencyjnym.

4.2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

H_1

Siódmiak Tomasz, Mangelings Debby, Vander Heyden Yvan, Ziegler-Borowska Marta, Marszałł Michał Piotr

High enantioselective Novozym 435-catalyzed esterification of (*R,S*)-flurbiprofen monitored with a chiral stationary phase;

Appl. Biochem. Biotechnol. **2015**: Vol. 175, s. 2769-2785.

IF = 1.606

MNiSW: 20.000

H_2

Siódmiak Tomasz*, Haraldsson Gudmundur G., Dulęba Jacek, Ziegler-Borowska Marta, Siódmiak Joanna, Marszałł Michał Piotr

Evaluation of designed immobilized catalytic systems: activity enhancement of lipase B from *Candida antarctica*;

Catalysts; **2020**: Vol. 10, nr 8, s. 876, 1-21.

IF: 4.146

MNiSW: 100.000

*autor korespondencyjny

H_3

Dulęba Jacek, **Siódmiak Tomasz***, Marszałł Michał Piotr

The influence of substrate systems on the enantioselective and lipolytic activity of immobilized Amano PS from *Burkholderia cepacia* lipase (APS-BCL)

Process Biochem. **2022**: Vol. 120, s. 126-137.

IF: 4.885

MNiSW: 70.000

*autor korespondencyjny

H_4

Siódmiak Tomasz*, Siódmiak Joanna, Mastalerz Rafał, Kocot Natalia, Dulęba Jacek, Haraldsson Gudmundur G., Wątróbska-Świetlikowska Dorota, Marszałł Michał Piotr
Climatic chamber stability tests of lipase-catalytic octyl-sepharose systems

Catalysts; **2023**: Vol. 13, nr 3, s. 1-16, 501.

IF: 4.501

MNiSW: 100.000

*autor korespondencyjny

H_5

Siódmiak Tomasz*, Dulęba Jacek, Haraldsson Gudmundur G., Siódmiak Joanna,
Marszałł Michał Piotr

The studies of sepharose-immobilized lipases: combining techniques for the enhancement of activity and thermal stability

Catalysts; **2023**: Vol. 13, nr 5, s. 1-16, 887.

IF: 4.501

MNiSW: 100.000

*autor korespondencyjny

Sumaryczne wartości punktacji dla cyklu prac wynoszą:

wskaźnik Impact Factor – **19,639**

punktacja MNiSW – **390**

Badania opisane w publikacji H_1 są efektem mojej współpracy naukowej z prof. Yvanem Vander Heydenem oraz prof. Debby Mangelings z Vrije University of Brussel (Belgia). Natomiast, badania opisane w publikacjach H_2, H_4, H_5 są efektem mojej współpracy naukowej z prof. Gudmundurem G. Haraldssonem z Uniwersytetu Islandzkiego (Islandia). Kopie prac H_1 - H_5 wskazanych jako osiągnięcie naukowe zawarto w załączniku 6. Oświadczenia współautorów określające ich merytoryczny wkład w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 7. Opis mojego merytorycznego wkładu w powstanie każdej pracy znajduje się w załączniku 4 (punkt I.2.). Analiza bibliometryczna potwierdzająca punktację IF oraz punktację MNiSW, sporządzona przez Bibliotekę Medyczną CM UMK, znajduje się w załączniku 5.

4.3. Omówienie celu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, uzyskanych wyników oraz ich potencjalnego wykorzystania

Wprowadzenie

W ostatnich dekadach intensywnie badanym obszarem nauk farmaceutycznych stały się biotechnologiczne metody otrzymywania enancjomerów leków chiralnych, wykorzystujące enzymy jako katalizatory [1]. Zastosowanie biokatalizy, stanowiącej alternatywne rozwiązanie do syntezy chemicznej, w pozyskiwaniu enancjomerów związków leczniczych, cieszy się dużym zainteresowaniem badaczy i przemysłu farmaceutycznego. Biokataliza nie wymaga drastycznych warunków reakcji, przez to jest bezpieczniejsza dla środowiska, co jest zgodne z filozofią „zielonej chemii” (ang. *green chemistry*). Z uwagi na możliwość pominięcia wielu etapów enancjoselektywnych syntez, reakcje biokatalityczne dają szansę na uproszczenie procedur otrzymywania leków chiralnych [2-3].

Do jednych z najczęściej stosowanych w przemyśle farmaceutycznym biokatalizatorów zalicza się lipazy. Odgrywają one kluczową rolę w kinetycznym rozdziale leczniczych związków racemicznych oraz w hydrolizie oraz transestryfikacji

olejów [4]. Aktywność enancjoselektywna lipaz pozwala na ich aplikację w otrzymywaniu enancjomerów związków chiralnych, wykazujących działanie farmakologiczne [5-7]. Natomiast, aktywność lipolityczna umożliwia hydrolizę triacylogliceroli do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu [8, 9]. Lipazy w przeważającej większości cechuje obecność tzw. „wieczka” (ang. *lid*) zakrywającego centrum aktywne enzymu [10], a także wysoka aktywność katalityczna, wykazywana zarówno w środowisku hydrofilowym, jak i lipofilowym [11]. Opisywane białka katalityczne mają zdolność dostosowywania się do środowiska reakcji poprzez modyfikację swojej aktywności, z wyłączeniem warunków reakcji, w których struktura enzymu ulega denaturacji [12]. Jednymi z najbardziej znanych i najszerzej wykorzystywanych lipaz w otrzymywaniu enancjomerów leków chiralnych są: lipaza B z *Candida antarctica* (CALB), lipaza z *Candida rugosa* (CRL) oraz lipaza z *Burkholderia cepacia* (BCL) [13-15].

W reakcjach biokatalizy powszechne zastosowanie znajdują lipazy w postaci wolnej (natywnej) [16]. Należy jednak zwrócić uwagę, iż równocześnie prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem skutecznych metod umożliwiających wzmocnienie ich aktywności katalitycznej. Jedną z technik pozwalającą na zwiększenie aktywności enzymatycznej oraz stabilności jest unieruchomienie (immobilizacja) lipaz na nośnikach [17,18]. Optymalne unieruchomienie lipazy powoduje zwiększenie jej odporności na zmienne warunki reakcji (np. temperatura, pH, siła jonowa), oraz znacznie ułatwia proces jej odzysku ze środowiska reakcji i ponowne użycie w kolejnych cyklach katalitycznych. Do najczęściej wdrażanych sposobów unieruchomienia zaliczamy adsorpcję, oddziaływania jonowe, wiązania kowalencyjne, sieciowanie (ang. *cross-linking*), enkapsulację (ang. *encapsulation*) lub „uwięzienie” („pułapkowanie”) (ang. *entrapment*) [19]. Każda z tych technik ma swoje ograniczenia, między innymi możliwość wycieku (ang. *leak*) enzymu z nośnika (adsorpcja, oddziaływania jonowe), zmiany w strukturze enzymu (wiązania kowalencyjne) lub utrudniona dyfuzja (enkapsulacja, uwięzienie) [12]. Zatem, uzasadnione jest stałe udoskonalanie metod immobilizacji, dające szansę na

osiągnięcie optymalnych aktywności katalitycznych [20]. Poza immobilizacją, w celu zwiększenia aktywności enzymów, implementuje się także inne techniki, na przykład użycie odpowiednich warunków temperaturowych (w zakresie lub poza zakresem optymalnym), jak również dodatek jonów metali do roztworów buforowych, w których przechowywane są immobilizowane biokatalizatory [21].

Jedną z najistotniejszych właściwości lipaz, branych pod uwagę podczas poszukiwania nowych biokatalizatorów, jest stabilność termiczna. Enzymy, charakteryzujące się dobrą termostabilnością są niezwykle istotne z punktu widzenia ich potencjalnej roli w przemyśle farmaceutycznym, ponieważ zwiększona stabilność umożliwia utrzymanie aktywności katalitycznej w różnych warunkach prowadzonych reakcji [22]. Zasadniczym problemem w badaniach stabilności lipaz jest brak precyzyjnych i ujednoliconych procedur, dlatego podejmuje się próby standaryzacji metod, dające możliwość oceny stabilności badanych enzymów w sposób wiarygodny i powtarzalny.

Ogromne zainteresowanie opracowywaniem nowych metod otrzymywania enancjomerów leków chiralnych, jak i optymalnych technik ich analizy wynika z faktu, iż poszczególne enancjomery mogą wykazywać różny profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny [23-24]. Zgodnie z rekomendacjami Agencji ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA), każdy enancjomer badanego nowego leku (ang. *investigational new drugs*, INDs) posiadającego centrum asymetrii musi zostać poddany analizie pod względem aktywności farmakologicznej i toksykologicznej [24-26]. W przypadku stwierdzenia znacznych działań niepożądanych, wykazywanych przez jeden z enancjomerów leku chiralnego, dla zwiększenia bezpieczeństwa farmakoterapii, wymagane jest ich rozdzielenie i stosowanie wyłącznie enancjomeru charakteryzującego się lepszym profilem farmakologicznym [27].

Cel badań

Celem naukowym badań, stanowiących osiągnięcie, była ocena potencjału aplikacyjnego wybranych lipaz w otrzymywaniu enancjomerów leków chiralnych. Oceny dokonałem na podstawie uzyskanych wyników aktywności katalitycznej (enancjoselektywnej oraz lipolitycznej) oraz stabilności testowanych lipaz, jako biokatalizatorów. W ramach realizacji zadań badawczych opracowałem optymalne protokoły immobilizacji lipaz na nośnikach w celu zwiększenia ich aktywności katalitycznej i stabilności. Jako reakcje modelowe do badania aktywności enancjoselektywnej zastosowałem estryfikację (*R,S*)-flurbiprofenu oraz transestryfikację (*R,S*)-1-fenylloetanolu. Aktywność lipolityczną badałem z wykorzystaniem emulsji oliwy z oliwek. Natomiast, do oceny stabilności termicznej lipaz zastosowałem komory klimatyczne.

Omówienie wyników

Na podstawie danych literaturowych oraz badań własnych, wykonywanych w Katedrze Chemii Leków CM UMK, oraz podczas staży naukowych na Vrije University of Brussel (Belgia) oraz Uniwersytecie Islandzkim (Islandia) wybrałem lipazy, które potencjalnie mogą charakteryzować się wysoką aktywnością katalityczną. Po etapie skryningu lipaz, przeprowadziłem optymalizację unieruchomienia wybranych enzymów na nośnikach, w celu uzyskania wyższej aktywności katalitycznej i stabilności, w porównaniu do form wolnych (nieimmobilizowanych). Oceeniłem aktywność enancjoselektywną i lipolityczną utworzonych biokatalizatorów, oraz zbadałem ich stabilność.

Publikacja nr 1 (H_1)

High Enantioselective Novozym 435-Catalyzed Esterification of (R,S)-Flurbiprofen Monitored with a Chiral Stationary Phase

Przeprowadziłem kinetyczny rozdział (R,S)-flurbiprofenu z zastosowaniem lipaz w formie wolnej oraz dostępnej komercyjnie, lipazy immobilizowanej - Novozym 435. Na podstawie otrzymanych chromatogramów, uzyskanych z użyciem chiralnych faz stacjonarnych, dokonałem oceny optymalizacji enzymatycznej enancjoselektywnej estryfikacji (R,S)-flurbiprofenu. W projekcie wykorzystałem lipazy z *Candida rugosa* i lipazy B z *Candida antarctica*, jako potencjalne katalizatory enzymatyczne. Zbadałem wpływ temperatury, rozpuszczalników organicznych (dichlorometan, dichloroetan, 1,2-dichloropropan oraz eter *tert*-butylowo-metylowy), alkoholu, jako akceptora grupy acylowej (metanol, etanol, *n*-propanol, i *n*-butanol), oraz czasu reakcji na enancjoselektywność i konwersję. Wykonałem optymalizację warunków chromatograficznych, takich jak dobór fazy stacjonarnej i ruchomej, prędkości przepływu eluentu, temperatury i objętości wstrzykiwanej próbki, co pozwoliło mi na uzyskanie dobrze rozdzielonych pików zarówno substratów, jak i produktów podczas jednej analizy chromatograficznej. Rozdział chromatograficzny (R)- i (S)-flurbiprofenu oraz ich estrów przeprowadziłem w normalnym układzie faz na polisacharydowej chiralnej fazie stacjonarnej – Lux Cellulose-3.

Wybrałem Novozym 435 jako najbardziej odpowiedni biokatalizator do otrzymywania produktów o wysokiej czystości enancjomerycznej. Wykonane kinetyczne rozdziały (R,S)-flurbiprofenu na drodze enancjoselektywnej estryfikacji z użyciem tego katalizatora, cechowały się wysoką enancjoselektywnością (E w zakresie 51,3–90,5; przy wartościach E powyżej 20 uznaje się reakcje za enancjoselektywne). W wyniku optymalizacji, opracowałem odpowiednie warunki do otrzymania estru metylowego (R)-flurbiprofenu, charakteryzującego się wysokim nadmiarem enancjomerycznym produktu $ee_p=96,3\%$. Enancjoselektywność reakcji

wyniosła $E=90,5$, konwersja $C=35,7\%$, a nadmiar enancjomeryczny substratu $ee_s=53,6\%$.

W oparciu o otrzymane wyniki, do kolejnego etapu badań (opisanego w publikacji nr 2 – H_2) wybrałem lipazę B z *Candida antarctica* w formie wolnej, celem jej immobilizacji na nośnikach polimerowych.

Publikacja nr 2 (H_2)

Evaluation of Designed Immobilized Catalytic Systems: Activity Enhancement of Lipase B from Candida antarctica

W publikacji przedstawiłem wyniki kompleksowych badań aktywności enancjoselektywnej i lipolitycznej lipazy B z *Candida antarctica* (CALB) immobilizowanej na dwunastu dostępnych komercyjnie nośnikach polimerowych, różniących się właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Aktywność enancjoselektywną badałem w reakcji enancjoselektywnej estryfikacji (*R,S*)-flurbiprofenu, natomiast aktywność lipolityczną oceniałem w reakcji hydrolizy emulsji oliwy z oliwek. Interpretowałem także wyniki, w odniesieniu do zjawisk istotnie wpływających na aktywność katalityczną enzymu, takich jak oddziaływanie między nośnikami, lipazą, substratami (akceptorami grupy acylowej), a środowiskiem reakcji (wodnym i organicznym). Analizy chromatograficzne wykonałem z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z chiralnymi fazami stacjonarnymi. Unieruchomioną na nośnikach lipazę oznaczyłem ilościowo z użyciem metody Bradforda, natomiast aktywność lipolityczną wyznaczyłem na podstawie wyników miareczkowania alkacymetrycznego. Zbadałem również wpływ temperatury oraz wartości pH środowiska reakcji na aktywność lipolityczną otrzymanych układów katalitycznych (forma immobilizowana).

Wyniki wskazują, że przy dobrze zaprojektowanym immobilizowanym układzie katalitycznym możliwe jest uzyskanie znacznie wyższej aktywności enzymu

niż w przypadku formy wolnej. Otrzymałem 43-krotny wzrost aktywności katalitycznej (wyrażonej jako wartość konwersji - C) lipazy unieruchomionej na polistyrenowym nośniku IB-S861, w porównaniu z aktywnością formy natywnej. Odnotowałem także wysokie wyniki aktywności lipolitycznej, wskazujące na hiperaktywację CALB (stosunek aktywności formy immobilizowanej do aktywności tej samej ilości lipazy w formie wolnej - 178%) immobilizowanej na poliakrylowym nośniku IB-D152. Wskazałem, jak niezwykle trudnym, często niemożliwym zadaniem było stworzenie uniwersalnego układu katalitycznego dedykowanego szerokiemu spektrum substratów. Nośnikami o potencjale aplikacyjnym, zarówno w organicznych, jak i wodnych środowiskach reakcji były: polipropylenowy (IB-S500) oraz krzemionkowy (IB-S60S). Projektowanie układu katalitycznego (nośnik – enzym) należy rozpatrywać indywidualnie, uwzględniając substraty i środowisko reakcji. Opisałem zależności pomiędzy środowiskiem reakcji (wodnym i organicznym), substratami ((*R,S*)-flurbiprofen, oliwa z oliwek), nośnikami oraz immobilizowaną lipazą. Oddziaływania te mogą powodować zwiększoną lub zmniejszoną aktywność enzymu. Istotne różnice w aktywnościach badanej immobilizowanej CALB obserwowałem w reakcjach, w których zmiennymi parametrami były wyłącznie środowisko reakcji oraz substraty. Unieruchomiona postać wykazywała stałą, wysoką aktywność katalityczną w zakresie temperatur od 25 do 55°C. Zauważyłem również wyższą aktywność katalityczną formy immobilizowanej w zakresie pH środowiska reakcyjnego od 6 do 9, w porównaniu z aktywnością formy natywnej. Uzyskane dane pozwoliły mi stwierdzić, że na etapie projektowania układu katalitycznego, gdy pożądane jest uzyskanie zwiększonej aktywności katalitycznej enzymu, należy wziąć pod uwagę oddziaływania lipazy z nośnikiem, nośnika z substratem oraz nośnika ze środowiskiem reakcji. W oparciu o otrzymane wyniki aktywności enzymatycznej CALB zdecydowałem, że w kolejnym etapie projektu (publikacja nr 3 - H_3) poddam badaniu inne lipazy o potencjale aplikacyjnym w otrzymywaniu leków chiralnych.

Publikacja nr 3 (H_3)

The influence of substrate systems on the enantioselective and lipolytic activity of immobilized Amano PS from Burkholderia cepacia lipase (APS-BCL)

W pracy przedstawiłem wyniki badań wpływu substratów oraz rozpuszczalników organicznych na właściwości katalityczne immobilizowanej lipazy Amano PS z *Burkholderia cepacia* (APS-BCL). Oceeniłem enancjoselektywność APS-BCL, immobilizowanej na nośniku poliakrylowym (IB-150A), w różnych warunkach reakcji (różne donory grupy acylowej – octan izopropenylu oraz winylu; siedem rozpuszczalników niewodnych: eter *tert*-butylowo-metylowy, dichlorometan, eter diizopropylowy, cykloheksan, *n*-heksan, izooktan, *n*-heptan). Stwierdziłem znaczący wpływ substratów oraz środowiska reakcji na aktywność katalityczną immobilizowanej APS-BCL.

Wykazałem wysoką enancjoselektywność badanej lipazy w kinetycznym rozdziale (*R,S*)-1-fenylloetanolu. Octan izopropenylu, stosowany jako donor grupy acylowej, pozwolił mi na uzyskanie konwersji reakcji wynoszącej $C = 49 \pm 0,4$ %. Natomiast, eter diizopropylowy ($C = 45 \pm 0,4\%$, $E = 519$, po 6 h reakcji) oraz *n*-heksan ($C = 49 \pm 0,1\%$, $E = 844$, 12 h reakcji) uznałem za najbardziej optymalne rozpuszczalniki, tworzące niewodne środowisko reakcji dla unieruchomionej APS-BCL. Immobilizacja enzymu na nośniku poliakrylowym (IB-150A), wpłynęła zarówno na zwiększenie aktywności enancjoselektywnej lipazy w reakcji otrzymywania octanu (*R*)-1-fenylloetylu, jak również na skrócenie czasu reakcji. Udowodniłem, że substraty i środowisko reakcji można wykorzystać jako użyteczne narzędzia do modyfikowania (zwiększania lub zmniejszania) aktywności lipazy. Opisane w pracy wyniki stanowią istotny wkład w zakresie projektowania układów katalitycznych. Biorąc pod uwagę otrzymane dane oceniłem, że aktywność katalityczna APS-BCL immobilizowanej na nośniku Immobead 150A, dotychczas słabo opisana w literaturze, ma istotny potencjał aplikacyjny w otrzymywaniu leków chiralnych.

Na podstawie wyników przedstawionych pracach (H_1, H_2, H_3) zdecydowałem, że w kolejnym etapie projektu (publikacja nr 4 – H_4) podejmę próbę zbadania stabilności immobilizowanych lipaz.

Publikacja nr 4 (H_4)

Climatic Chamber Stability Tests of Lipase-Catalytic Octyl-Sepharose Systems

W publikacji opisałem, przeprowadzoną przeze mnie, optymalizację immobilizacji lipazy B z *Candida antarctica* na nośniku Octyl-Sepharose CL-4B, w zakresie wpływu różnych wartości pH buforów oraz ich sił jonowych. Do badania stabilności, podczas przechowywania testowanej lipazy w formie suchej, zastosowałem komorę klimatyczną. Analizy aktywności lipolitycznej wykonałem z użyciem metody spektrofotometrycznej i miareczkowej.

Analiza danych literaturowych jednoznacznie wskazuje na brak usystematyzowanych wytycznych dotyczących badania stabilności immobilizowanych układów katalitycznych. Z tego powodu oraz w związku z szerokim zastosowaniem immobilizowanych lipaz w biokatalizie, podjąłem próbę ujednoczenia testów stabilności enzymów i opracowania uniwersalnych standardów. Do oceny stabilności układów katalitycznych wykorzystałem komorę klimatyczną, umożliwiającą prowadzenie badań w kontrolowanych, jednakowych i powtarzalnych warunkach (zgodnie z normami farmaceutycznymi dotyczącymi leków) temperatury, wilgotności i światła (w zakresie widzialnym). Eksperyment ten, stanowiący próbę wyznaczenia standardowych warunków testowania stabilności modeli katalitycznych lipaz, nie był wcześniej opisany w literaturze.

Uznałem, że immobilizacja CALB na nośniku Octyl-Sepharose CL-4B, przy użyciu opracowanego protokołu: bufor cytrynianowy o pH 4 i sile jonowej 500 mM, jest optymalnym rozwiązaniem zwiększającym (hiperaktywacja) aktywność lipolityczną enzymu w badanym układzie reakcyjnym (oliwa z oliwek jako substrat)

– odzysk aktywności (ang. *activity recovery*) = $116,10 \pm 1,70$ %. Unieruchomiona CALB poddana działaniu drastycznych warunków temperatury i wilgotności w komorze klimatycznej charakteryzowała się bardzo dobrą stabilnością - aktywność resztkowa (ang. *residual activity*) lipazy w formie suchej, po 7 dniach przechowywania, wyniosła $218 \pm 7,3\%$. Zaprezentowana w mojej pracy aplikacja komory klimatycznej do badania stabilności unieruchomionych lipaz, jest nowym rozwiązaniem w zakresie biokatalizy enzymatycznej. Komory klimatyczne gwarantują, iż testy przechowywania będą przeprowadzane zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ang. *International Conference on Harmonization, ICH*). Należy podkreślić, że warunki badania w komorze są stabilne i powtarzalne oraz spełniają restrykcyjne wymagania przemysłu farmaceutycznego. Zatem, zaproponowana przeze mnie metoda badania stabilności enzymów ma potencjał do standaryzacji i ujednolicenia oceny międzylaboratoryjnej tworzonych biokatalizatorów, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia ich przemysłowego zastosowania.

Uzyskane wyniki pozwoliły mi na podjęcie decyzji o zakresie planowanych badań w kolejnym etapie realizacji projektu (publikacja nr 5 – H_5). Uznałem za istotne zbadanie wpływu przechowywania, w wodnych buforach, immobilizowanych lipaz na ich aktywność katalityczną i stabilność.

Publikacja nr 5 (H_5)

The Studies of Sepharose-Immobilized Lipases: Combining Techniques for the Enhancement of Activity and Thermal Stability

W pracy opisałem zastosowanie komory klimatycznej do badania stabilności termicznej lipazy z *Candida rugosa* OF (CRL-OF) oraz lipazy B z *Candida antarctica* (CALB), unieruchomionych na nośniku Octyl-Sepharose CL-4B, przechowywanych w wodnych roztworach buforowych. Lipazy te zostały wybrane ze względu na różnice w budowie, w szczególności w odniesieniu do wieczka (ang. *lid*)

zakrywającego miejsce aktywne enzymu. W ramach projektu zbadalem wpływ rozpuszczalników (woda, bufor cytrynianowy oraz 1,2-dichloropropan), temperatury oraz światła w zakresie widma światła widzialnego (400–800 nm), a także dodatku jonów wapnia na stabilność i aktywność immobilizowanych biokatalizatorów. Testowałem również przechowywanie układów katalitycznych (lipaz unieruchomionych) w buforach o różnej sile jonowej - test 24-godzinny. W zakresie procedur immobilizacji, zoptymalizowałem parametry - czas i temperaturę, a następnie oceniłem wpływ ich zmiany na aktywność katalityczną, a także na ilość unieruchomionego białka. Analizy wykonałem z użyciem metody spektrofotometrycznej i miareczkowej. W celu zwiększenia stabilności termicznej zastosowałem nowe rozwiązanie metodologiczne - „techniki łączone”. Połączyłem dwie metody: (a) immobilizację lipaz na nośniku, z (b) ich przechowywaniem, po immobilizacji, w komorze klimatycznej w ekstremalnie wysokiej temperaturze, w buforze o wysokiej sile jonowej i niskim pH, z dodatkiem jonów wapnia. Badania stabilności termicznej unieruchomionych lipaz (CRL-OF oraz CALB) przechowywanych w buforach wodnych w komorze klimatycznej (warunki stresowe – temperatura 65°C) wskazały na doskonałą stabilność CALB, w przeciwieństwie do CRL-OF.

Przechowywanie immobilizowanej CALB w komorze klimatycznej w buforze cytrynianowym (pH 4,0, 500 mM) wpłynęło na wzrost jej aktywności lipolitycznej w reakcji hydrolizy oliwy z oliwek. Należy podkreślić, że jony wapnia (Ca^{2+}) wprowadzone do buforu cytrynianowego dodatkowo wzmocniły aktywność CALB, w porównaniu z próbkami immobilizowanymi, które nie zostały poddane przechowywaniu w komorze (aktywność resztkowa wyniosła $564,5 \pm 21,6\%$). Test 24-godzinny wykazał, że optymalna siła jonowa buforu do przechowywania CALB mieściła się w zakresie od 300 do 700 mM, podczas gdy dla CRL-OF bardziej korzystna była niższa siła jonowa - 50 mM. Aplikacja metody - „technik łączonych”: immobilizacji lipazy na nośniku w buforze o wysokiej sile jonowej, a następnie przechowywanie immobilizowanych lipaz w komorze klimatycznej w warunkach

stresowych (65°C) oraz wysokiej siły jonowej buforu z dodatkiem jonów wapnia jest strategią nową, nieopisaną wcześniej w literaturze. Warto zaznaczyć, że wykorzystanie komór klimatycznych potencjalnie może umożliwić ujednoczenie otrzymywanych wyników oraz efektywną i rzetelną analizę międzylaboratoryjną, zgodną z wytycznymi ICH oraz wymaganiami przemysłu farmaceutycznego. Badania stabilności termicznej mogą zostać także potencjalnie wykorzystane do testowania innych hydrolaz.

Wnioski

Wyniki badań, stanowiących osiągnięcie naukowe, pozwoliły na sformułowanie wniosków:

- ▶ najwyższą aktywność katalityczną wykazują lipazy (wyższą niż formy wolne):
 - lipaza B z *Candida antarctica* immobilizowana na polistyrenowym nośniku IB-S861 (aktywność enancjoselektywna) oraz poliakrylowym nośniku IB-D152 (aktywność lipolityczna), a także nośniku Octyl-Sepharose CL-4B (aktywność lipolityczna);
 - lipaza Amano PS z *Burkholderia cepacia* immobilizowana na nośniku poliakrylowym IB-150A (aktywność enancjoselektywna);

- ▶ lipaza B z *Candida antarctica* immobilizowana na nośniku Octyl-Sepharose CL-4B charakteryzuje się doskonałą stabilnością termiczną podczas przechowywania w komorze klimatycznej;

- ▶ unieruchomioną lipazę B z *Candida antarctica* oraz Amano PS z *Burkholderia cepacia* cechuje wysoki potencjał aplikacyjny w otrzymywaniu enancjomerów leków chiralnych;

Osiągnięcie naukowe, stanowiące wkład w dyscyplinę, obejmuje opracowanie przeze mnie metod analizy związków chiralnych, immobilizacji biokatalizatorów oraz oceny stabilności:

- w zakresie analizy farmaceutycznej - opracowałem metody rozdziału chromatograficznego (*R,S*)-flurbiprofenu i jego estrów w jednym cyklu analitycznym z zastosowaniem chiralnych faz stacjonarnych (ang. *chiral*-HPLC, Lux Cellulose-3); jak również metody rozdziału chromatograficznego (*R,S*)-1-fenyloetanolu i jego estrów (ang. *chiral*-HPLC, Lux Cellulose-3);

Należy wspomnieć, że ustalone przeze mnie warunki chromatograficzne z użyciem chiralnych faz stacjonarnych pozwalają na monitorowanie, w jednym cyklu analitycznym, dobrze rozdzielonych pików enancjomerów, zarówno substratów, jak i produktów reakcji, co w analizie związków chiralnych jest niezwykle trudne do uzyskania.

- w aspekcie biokatalizy leków chiralnych - opracowałem nowe, optymalne protokoły immobilizacji umożliwiające otrzymanie biokatalizatorów w formie immobilizowanej (unieruchomione lipazy na nośnikach), cechujących się wyższymi parametrami aktywności (enancjoselektywnej i lipolitycznej) oraz stabilności, w porównaniu do lipaz w formie wolnej;

* opracowałem nową metodę, tzw. „technik łączonych”: immobilizacji lipaz w odpowiednich warunkach procesu, a następnie przechowywania w buforach o wysokiej sile jonowej z dodatkiem jonów wapnia w ekstremalnie wysokich temperaturach – metoda nienotowana w literaturze, umożliwiająca uzyskanie znacznie wyższej aktywności i stabilności lipaz, niż technika wykorzystująca tylko immobilizację (H_5);

- w odniesieniu do oceny stabilności - zastosowałem komory klimatyczne do badania stabilności immobilizowanych lipaz – rozwiązanie to nie było wcześniej opisane w literaturze (H_4);

Wynikiem prowadzonych prac badawczych jest otrzymanie biokatalizatorów (immobilizowanych lipaz) cechujących się znacznym potencjałem aplikacyjnym (wysoka aktywność i stabilność) w przemyśle farmaceutycznym w pozyskiwaniu enancjomerów leków chiralnych. Ponadto, opracowana przeze mnie metoda „technik łączonych” wykorzystująca stosowanie ekstremalnie wysokich temperatur podczas przechowywania immobilizowanych układów katalitycznych otwiera dyskusję na temat wpływu tego rozwiązania na podnoszenie aktywności i stabilności immobilizowanych enzymów. Opisane w mojej pracy (H_5) wyniki pokazują, że połączenie trzech czynników, czyli warunków stresu temperaturowego z buforem cytrynianowym o sile jonowej 500mM, i obecnością jonów wapnia umożliwia uzyskanie znacznego wzrostu katalitycznej aktywności badanej lipazy. Nie bez znaczenia na efekt wzmocnienia aktywności, jak wspomniałem w pracy H_5, są elementy budowy lipaz, a w szczególności obecność wieczka (ang. *lid*). Mechanizmy odpowiedzialne za wzrost aktywności lipaz w proponowanych warunkach są nie do końca wyjaśnione i opisane w literaturze, na co wskazałem w mojej pracy (H_5). Zatem przed naukowcami zajmującymi się biokatalizą stoi wyzwanie wyjaśnienia w sposób jednoznaczny tego zjawiska.

Należy także podkreślić, iż zaproponowana przeze mnie ujednolicona, zgodna z wytycznymi Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ICH), metoda badania stabilności immobilizowanych lipaz w komorze klimatycznej jest nowością w zakresie biokatalizy farmaceutycznej.

Literatura

- [1] Sikora, A.; Siódmiak, T.; Marszałł, M.P. Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* Lipases. *Chirality* **2014**, 26, 663–669.
- [2] Choi, J.M.; Han, S.S.; Kim, H.S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1443–1454.

- [3] Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312.
- [4] Duleba, J.; Siódmiak, T.; Marszałł, M.P. Amano Lipase PS from *Burkholderia cepacia*—Evaluation of the Effect of Substrates and Reaction Media on the Catalytic Activity. *Curr. Org. Chem.* **2020**, *24*, 798–807.
- [5] Dąbkowska, K.; Szewczyk, K.W. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers, *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 147–153.
- [6] Ghanem, A.; Aboul-Enein, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* **2005**, *17*, 1–15.
- [7] Manoel, E.A.; Pais, K.C.; Cunha, A.G.; Coelho, M.A.Z.; Freire, D.M.G.; Simas A.B.C., On the kinetic resolution of sterically hindered *myo*-inositol derivatives in organic media by lipases, *Tetrahedron Asymmetry* **2012**, *23*, 47–52.
- [8] SanGiovanni, J.P.; Chew, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina, *Prog. Retin. Eye Res.* **2005**, *24*, 87–138.
- [9] Das, U.N. Essential fatty acids - a review, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2006**, *7*, 467–482.
- [10] Zisis, T.; Freddolino, P.L.; Turunen, P.; van Teeseing, M.C.F.; Rowan, A.E.; Blank, K.G. Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5969–5979.
- [11] Sanchez, D.A.; Tonetto, G.M.; Ferreira, M.L. *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 6–24.
- [12] Siódmiak, T.; Duleba, J.; Kocot, N.; Watróbska-Świetlikowska, D.; Marszałł, M.P. The High ‘Lipolytic Jump’ of Immobilized Amano A Lipase from *Aspergillus niger* in Developed ‘ESS Catalytic Triangles’ Containing Natural Origin Substrates. *Catalysts* **2022**, *12*, 853.
- [13] de Maria, P.D.; Sanchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Alcantara, A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 180–196.
- [14] Cunha, D.; Bartkevihi, L.; Robert, J.M.; Cipolatti, E.P.; Ferreira, A.T.S.; Oliveira, D.M.P.; Gomes-Neto, F.; Almeida, R.V.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, D.M.G.; et al.

Structural differences of commercial and recombinant lipase B from *Candida antarctica*: An important implication on enzymes thermostability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *140*, 761–770.

[15] Sanchez, D.A.; Tonetto, G.M.; Ferreira, M.L. *Burkholderia cepacia* lipase: a versatile catalyst in synthesis reactions, *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 6–24.

[16] Melais, N.; Aribi-Zouioueche, L.; Riant, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. *C. R. Chim.* **2016**, *19*, 971–977.

[17] Thangaraj, B.; Solomon, P.R. Immobilization of Lipases—A Review. Part II: Carrier Materials. *Chembioeng. Rev.* **2019**, *6*, 167–194.

[18] Thangaraj, B.; Solomon, P.R. Immobilization of Lipases—A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *Chembioeng. Rev.* **2019**, *6*, 157–166.

[19] Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.

[20] Boudrant, J.; Woodley, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process. Biochem.* **2020**, *90*, 66–80.

[21] Arana-Pena, S.; Rios, N.S.; Carballares, D.; Goncalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. *Catal. Today* **2021**, *362*, 130–140.

[22] Hamdan, S.H.; Maiangwa, J.; Ali, M.S.M.; Normi, Y.M.; Sabri, S.; Leow, T.C. Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 7069–7094.

[23] Wu, L.M.; Vogt, F.G. A review of recent advances in mass spectrometric methods for gas-phase chiral analysis of pharmaceutical and biological compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *69*, 133–147.

[24] Khan, W.; Wang, Y.H.; Chaurasiya, N.D.; Nanayakkara, N.D.; Herath, H.B.; Harrison, K.A.; Dale, G.; Stanford, D.A.; Dahl, E.P.; McChesney, J.D.; Gul, W.; ElSohly,

M.A.; Khan, S.I.; Fasinu, P.S.; Khan, I.A.; Tekwani, B.L.; Walker, L.A. Comparative single dose pharmacokinetics and metabolism of racemic primaquine and its enantiomers in human volunteers, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2022**, *45*.

[25] Solano, D.M.; Hoyos, P.; Hernaiz, M.J.; Alcantara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196-207.

[26] Blanco, S.; Macario, A.; Lopez, J.C. The structure of isolated thalidomide as reference for its chirality-dependent biological activity: a laser-ablation rotational study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 13705-13713.

[27] Handley, D.A. Single-isomer beta-agonists, *Pharmacotherapy*, **2001**, *21*, 21S-27S.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

- od października 2021 r. do chwili obecnej jestem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Technologii Postaci Leku na Wydziale Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM) - dodatkowe miejsce zatrudnienia. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań naukowych, wykonywanych w Zakładzie Technologii Postaci Leku (PUM) opisane zostały w publikacjach:

- a) Siódmiak Tomasz, Siódmiak Joanna, Mastalerz Rafał, Kocot Natalia, Dulęba Jacek, Haraldsson G.G., Wątróbska-Świetlikowska D., Marszał Michał Piotr
Climatic chamber stability tests of lipase-catalytic octyl-sepharose systems
Catalysts; 2023: Vol. 13, nr 3, s. 1-16, 501.
- b) Siódmiak Tomasz, Dulęba Jacek, Kocot Natalia, Wątróbska-Świetlikowska Dorota, Marszał Michał Piotr

The high 'lipolytic jump' of immobilized Amano A lipase from *Aspergillus niger* in developed 'ESS catalytic triangles' containing natural origin substrates; *Catalysts*; 2022: Vol. 12, nr 8, s. 1-22, 853.

- w 2012 r. odbyłem miesięczny staż naukowy (nawiązanie współpracy naukowej) na Vrije University of Brussel, Department of Analytical Chemistry, Applied Chemometrics and Molecular Modelling, Belgium; opiekunami stażu byli prof. Yvan Vander Heyden oraz prof. Debby Mangelings;

W ramach realizacji stażu opracowałem metody chromatograficzne analizy związków chiralnych z wykorzystaniem chiralnych faz stacjonarnych (ang. *chiral-HPLC*). Wyniki badań opisałem w publikacji:

Siódmiak Tomasz, Mangelings Debby, Vander Heyden Yvan, Ziegler-Borowska Marta, Marszał Michał Piotr

High enantioselective Novozym 435-catalyzed esterification of (*R,S*)-flurbiprofen monitored with a chiral stationary phase;

Appl. Biochem. Biotechnol. **2015**: Vol. 175, s. 2769-2785.

- w roku 2011 oraz w 2014 odbyłem „wizyty przygotowawcze” (nawiązanie współpracy naukowej) w ramach programu Fundusz Stypendialny i Szkoleniowy; Fundacja Rozwoju Systemu Edukacji (FRSE) - (FSS/2013/R2/PV/W/0044 oraz FSS/2011/V/D3/W/0097) na Uniwersytecie Islandzkim (Faculty of Physical Sciences, University of Iceland), Islandia; opiekunem był prof. Gudmundur G. Haraldsson;

Wizyty zaowocowały wieloletnią współpracą naukową. Wyniki wspólnych badań opisałem w publikacjach:

- a) Siódmiak Tomasz, Haraldsson Gudmundur G., Dulęba Jacek, Ziegler-Borowska Marta, Siódmiak Joanna, Marszałł Michał Piotr
Evaluation of designed immobilized catalytic systems: activity enhancement of lipase B from *Candida antarctica*; *Catalysts*; 2020: Vol. 10, nr 8, s. 876, 1-21.
- b) Siódmiak Tomasz, Siódmiak Joanna, Mastalerz Rafał, Kocot Natalia, Dulęba Jacek, Haraldsson Gudmundur G., Wątróbska-Świetlikowska Dorota, Marszałł Michał Piotr
Climatic chamber stability tests of lipase-catalytic octyl-sepharose systems
Catalysts; 2023: Vol. 13, nr 3, s. 1-16, 501.
- c) Siódmiak Tomasz, Dulęba Jacek, Haraldsson Gudmundur G., Siódmiak Joanna, Marszałł Michał Piotr.; The studies of sepharose-immobilized lipases: combining techniques for the enhancement of activity and thermal stability
Catalysts; 2023: Vol. 13, nr 5, s. 1-16, 887.

- w 2015 roku odbyłem dwutygodniowy staż „Soft Skills and Entrepreneurship”, Lund University (Szwecja), TransFormation.doc, projekt Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; dofinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach podziałania 1.1.3 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG) „Wsparcie systemu zarządzania badaniami naukowymi i ich wynikami”

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Działalność i osiągnięcia dydaktyczne

- prowadzę zajęcia laboratoryjne oraz seminaria na kierunku Farmacja z przedmiotów Chemia Leków – III rok Farmacji (CM UMK) oraz Technologia

Postaci Leku (PUM) – III, IV oraz V rok Farmacji; ponadto, przygotowuję materiały dydaktyczne (prezentacje, konspekty) oraz opracowuję metodologię zajęć praktycznych;

- jestem/byłem opiekunem (promotorem) prac magisterskich (dwunastu) (CM UMK, PUM) – 50% moich magistrantów posiada już stopień doktora lub są/będą uczestnikami studiów doktoranckich/Szkoły Doktorskiej, co jednoznacznie świadczy o bardzo silnym wpływie mojej postawy naukowo-dydaktycznej na decyzje studentów o wyborze dalszej drogi naukowej;

- jestem/byłem recenzentem prac magisterskich (dziewięciu);

- jestem opiekunem naukowym Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Chemii Leków (CM UMK); Koło Naukowe uzyskało dofinansowanie w ramach konkursu „Grants4NCUStudents” na zadania badawcze i wyjazdy zagraniczne realizowane przez studentów i doktorantów Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; uczestnicy koła naukowego prezentują wyniki na konferencjach naukowych oraz są współautorami publikacji naukowych (H_4 – mgr farm. Natalia Kocot oraz mgr farm. Rafał Mastalerz);

- prowadzę wykłady w ramach szkolenia specjalizacyjnego z zakresu Farmacji Aptecznej oraz wykłady dla specjalistów z Farmacji Szpitalnej (w ramach PTFarm);

- jestem promotorem pomocniczym dwóch rozpraw doktorskich – obrona pierwszej odbyła się w 2019 roku (dr n. farm. Adam Sikora), obrona drugiej (mgr farm. Jacek Dulęba) planowana jest na rok 2023;

Działalność i osiągnięcia organizacyjne oraz popularyzujących naukę

- pełnię funkcję Pełnomocnika Rektora UMK ds. kształcenia podyplomowego oraz doskonalenia zawodowego farmaceutów;

- jestem wykładowcą w ramach projektów promujących naukę, między innymi „Warsztaty praktyczne dla uczniów szkół ponadpodstawowych”; „Drzwi Otwarte w Collegium Medicum” – Wydział Farmaceutyczny CM UMK;
- jestem współorganizatorem konferencji – EUPATI – Europejska Akademia Pacjentów w obszarze Terapii innowacyjnych; Federacja Pacjentów Polskich; Bydgoszcz CM UMK, 2016 r. (<https://www.cm.umk.pl/aktualnosci-2/3368-konferencja-eupati-w-collegium-medicum-w-bydgoszczy.html>)

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

7.1. Udział w innych projektach naukowych

Projekt naukowy nr 1

Zastosowanie nowych magnetycznych nanocząstek do badań nad oddziaływaniami supramolekularnymi ksenoandrogenów z receptorem androgenowym (AR)

W latach 2012-2015 byłem współwykonawcą projektu realizowanego w ramach grantu SONATA (NCN 2011/03/D/NZ7/02296, SONATA 2, Narodowe Centrum Nauki, kierownikiem projektu był prof. dr hab. Michał Piotr Marszałł) we współpracy z Laboratorium Badań Klinicznych będących w strukturach NIH w Stanach Zjednoczonych (dr Ruin Moaddel) oraz z Katedrą Chemii Biomedycznej i Polimerów UMK (dr hab. Marta Ziegler-Borowska). Projekt dotyczył zastosowania nowych magnetycznych nanocząstek do badań nad oddziaływaniami supramolekularnymi ksenoandrogenów z receptorem androgenowym (AR).

Opracowano technikę separacji magnetycznej pozwalającą na szybkie i skuteczne wyłowienie znanych ligandów z modelowej mieszaniny. Zastosowana

metoda może potencjalnie umożliwić przeprowadzenie przesiewowej identyfikacji w kierunku poszukiwania nieznanymi ksenoandrogenów w surowcach roślinnych, jak również ułatwić wyjaśnienie nieznanymi do tej pory mechanizmów aktywności androgennej danej grupy ksenobiotyków.

Wyniki badań opisano w publikacji:

Marszałł Michał Piotr, Sroka Wiktor Dariusz, Sikora Adam, Chełminiak Dorota, Ziegler-Borowska Marta, Siódmiak Tomasz, Moaddel Ruin

Ligand fishing using new chitosan based functionalized Androgen Receptor magnetic particles; J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2016: Vol. 127, s. 129-135.

Mój wkład obejmował udział w części eksperymentalnej – immobilizacji białka na cząstkach magnetycznych.

Projekt naukowy nr 2

Jednoczesne oznaczanie chlorowodoru cyprofloksacyny i hydrokortyzonu w kroplach do uszu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Celem badań było zaprojektowanie i walidacja oznaczania ilościowego dwóch substancji czynnych (chlorowodoru cyprofloksacyny oraz hydrokortyzonu) oraz środka konserwującego (alkoholu benzyloвого) w kroplach do uszu, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Wyniki procedury walidacyjnej (między innymi, wysoki odzysk, brak interferujących pików w czasach retencji odpowiadających analitom) potwierdzają, że opracowana metoda chromatograficzna może być wykorzystana w rutynowej analizie kropli do uszu. Badania realizowano w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (projekt badawczy nr VB/04/2012/18); Projekt realizowany z Programu

Pilotażowego w województwie kujawsko-pomorskim „Voucher badawczy” Oś Priorytetowa 5 - Wzmocnienie konkurencyjności przedsiębiorstw, Działanie 5.4: Wzmocnienie regionalnego potencjału badań i rozwoju technologii w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Kujawsko – Pomorskiego na lata 2007-2013.

Wyniki badań opisano w publikacji:

Ronowicz Joanna, Kupcewicz Bogumiła, Pałkowski Łukasz, Bilski Piotr, Siódmiak Tomasz, Marszał Michał Piotr, Krysiński Jerzy

Simultaneous determination of ciprofloxacin hydrochloride and hydrocortisone in ear drops by high performance liquid chromatography

Chem. Papers; 2014: Vol. 68, nr 7, s. 861-870.

Mój wkład obejmował udział w części eksperymentalnej – walidacji metody chromatograficznej.

Projekt naukowy nr 3

Oznaczanie haloperidolu w preparatach farmaceutycznych metodą densytometryczną

HPTLC UV

Celem badania była ocena zastosowania cieczy jonowych jako modyfikatorów fazy ruchomej w badaniach ilościowych haloperidolu z wykorzystaniem techniki HPTLC UV. Aplikacja cieczy jonowej - [EMIM][BF₄] w układach chromatograficznych (acetonitryl/woda) z hydrofobową krzemionką wykazała jej użyteczność w badaniach densytometrycznych. Dodatek cieczy jonowej pozwolił rozwiązać problem niekorzystnych, silnych oddziaływań występujących między związkami o charakterze słabych zasad organicznych a niezwiązanymi (kwasowymi) grupami

silanolowymi obecnymi na powierzchni krzemionkowej fazy stacjonarnej. Odpowiednio przygotowane i zmodyfikowane układy chromatograficzne okazały się być pomocnym, alternatywnym narzędziem w kontroli jakości haloperidolu (w stosunku do metod zalecanych przez Farmakopeę).

Wyniki badań opisano w publikacji:

Mieszkowski Dominik, Siódmiak Tomasz, Marszał Michał Piotr

1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate as an alternative mobile phase additives for determination of haloperidol in pharmaceutical formulation by HPTLC UV densitometric method

J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2014: Vol. 37, s. 1524-1534.

Mój wkład obejmował konsultacje merytoryczne w zakresie optymalizacji metod chromatograficznych oraz korektę manuskryptu.

7.2. Granty

2018-2019 Grant Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości - „Bony na Innowacje dla MŚP” – **kierownik projektu** (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Collegium Medicum w Bydgoszczy; Wydział Farmaceutyczny był wykonawcą usługi przeprowadzenia prac badawczo-rozwojowych na zlecenie firmy KRW Solutions Rafał Włodarczyk)

Opracowanie nowatorskiego suplementu diety wspomagającego fizjologiczną funkcję nerek zwierząt domowych

Projekt o numerze POIR.02.03.02-14-0121/17 realizowany w ramach Poddziałania 2.3.2 „Bony na innowacje dla MŚP” w ramach II osi priorytetowej: „Wsparcie otoczenia i potencjału przedsiębiorstw do prowadzenia działalności B+R+I” Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014 – 2020.

2014-2017 Grant Preludium (NCN) UMO-2013/09/N/NZ7/03557

– **kierownik projektu**

Projektowanie enzymatycznych układów do badania leków chiralnych z wykorzystaniem superparamagnetycznych nanocząstek jako nośników dla biokatalizatorów

2012-2015 Grant SONATA, NCN 2011/03/D/NZ7/02296 – **współwykonawca**

Badania nad oddziaływaniami supramolekularnymi ksenoandrogenów z receptorem androgenowym

2010-2011 Grant „Iuventus Plus” 0246/P01/2010/70 - Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – **współwykonawca**

Nowoczesne pozyskiwanie substancji leczniczych na drodze enancjoselektywnej syntezy z wykorzystaniem katalizatorów enzymatycznych

7.3. Kursy

- ▶ Kurs Chemii Obliczeniowej (Toruńska Szkoła Chemii Obliczeniowej), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Polska (2012);
- ▶ Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska, roczny kurs; (7. program ramowy, Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Europejski Fundusz Społeczny, 4.1. Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni oraz zwiększenie

liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy) - „Nowoczesne techniki badawcze stosowane w biologii, biotechnologii i diagnostyce” (2010-2011);

- ▶ dwa półroczne kursy „Nowoczesne metody rozdzielania związków – GC, TLC, HPLC” oraz „Aplikacje HPLC”, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra Chemii Organicznej (2008 - 2010);
- ▶ dwutygodniowy kurs „Soft Skills and Entrepreneurship”, Lund University (Szwecja), TransFormation.doc, projekt Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; dofinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach podziałania 1.1.3 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG) „Wsparcie systemu zarządzania badaniami naukowymi i ich wynikami” (2015);

7.4. Pozostała działalność naukowa

Recenzowanie publikacji:

- Elsevier (Catalysis Communications)
- MDPI (Molecules)
- Springer (Chemical Papers)

Członkostwo w towarzystwach naukowych:

- Stowarzyszenie na Rzecz Dobrej Praktyki Badań Klinicznych w Polsce (GCPpl)- od 2019 r.

7.5. Współpraca z otoczeniem gospodarczym

- ▶ trzymiesięczny staż w farmaceutycznej spółdzielni pracy „Filofarm”; Dział Badawczo-Rozwojowy, Bydgoszcz; projekt „Z nauki do biznesu” współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu

VIII: Regionalne kadry gospodarki, Działania 8.2. Transfer wiedzy, Poddziałania 8.2.1 Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw; realizowany przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; (2012 r.);

- sześcioletni staż w firmie „**Axfarm**” sp. z o.o., Bydgoszcz; projekt „Z nauki do biznesu – II edycja” współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego; Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet VIII: Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2. Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.1. Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw, realizowany przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; (2014 r.);

- współpraca z firmą „**Axpharm**” sp. z o.o. Bydgoszcz, Polska
 - wykonywałem analizy farmaceutyczne (wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC) - „Opracowanie nowego złożonego produktu leczniczego do stosowania w leczeniu stanów zapalnych ucha zewnętrznego i środkowego w postaci kropli/sprayu do ucha zawierającego antybiotyk z grupy chinolonów oraz pochodną steroidową”; badania realizowano w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (projekt badawczy nr VB/04/2012/18); projekt realizowany z Programu Pilotażowego w województwie kujawsko-pomorskim „Voucher badawczy” Oś Priorytetowa 5 - Wzmocnienie konkurencyjności przedsiębiorstw, Działanie 5.4: Wzmocnienie regionalnego potencjału badań i rozwoju technologii w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Kujawsko – Pomorskiego na lata 2007-2013;

- Współpraca z firmą **Axfarm** sp. z o.o. Bydgoszcz, Polska
 - wykonywałem analizy farmaceutyczne (wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC) - „Opracowanie składu i postaci farmaceutycznej (krople lub spray) nowego leku przeciwbólowego stosowanego miejscowo w stanach

zapalnych ucha”; numer projektu badawczego: VB/01/2014/127; Voucher badawczy”; projekt finansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Kujawsko-Pomorskiego na lata 2007-2013; Działania 5.4 Wzmocnienie regionalnego potencjału badań i rozwoju technologii;

- Współpraca z firmą **KRW Solutions Rafał Włodarczyk** – „Opracowanie nowatorskiego suplementu diety wspomagającego fizjologiczną funkcję nerek zwierząt domowych”; w ramach projektu „Bony na Innowacje dla MŚP” (POIR.02.03.02-14-0121/17); realizowany w ramach Poddziałania 2.3.2 „Bony na innowacje dla MŚP” w ramach II osi priorytetowej: „Wsparcie otoczenia i potencjału przedsiębiorstw do prowadzenia działalności B+R+I” Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014 – 2020
– **kierowałem projektem oraz byłem głównym wykonawcą**

7.6. Nagrody

- Zespołowe wyróżnienie Rektora UMK – 2013 r.
- Nagroda Rektora UMK (indywidualna III stopnia) – 2015 r.
- Zespołowe wyróżnienie Rektora UMK – 2015 r.
- Nagroda zespołowa Rektora UMK (II stopnia) – 2015 r.
- Nagroda zespołowa Rektora UMK (III stopnia) – 2017 r.
- Nagroda zespołowa Rektora UMK – 2021 r.

7.7. Patenty

Siódmiak Tomasz, Ziegler-Borowska Marta, Marszał Michał Piotr

2017; PL, 227525

*Ester metylowy kwasu 2-amino-2-(4-dihydroksyborylobenzylo)-3-metylobutanowego
i sposób jego otrzymywania*

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu: PL

411939, 10.04.2015, 29.12.2017, WUP 12/17;

MNiSW: 75.000



.....
(podpis wnioskodawcy)