



Wrocław 20.03.2015

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Toporkiewicz p.t.

**„Liposomowy nośnik leku generycznego przeznaczony do celowanej terapii nowotworowej krwi”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy prac nad opracowanej złożonej strategii farmakologicznej łączącej terapię genetyczną z klasycznym leczeniem farmakologicznym (mitoksantronem) nowotworów krwi. Jednym z podstawowych problemów związanych ze stosowaniem chemioterapii w leczeniu nowotworów jest niski indeks terapeutyczny stosowanych specyfików oraz oporność lekowa nabywana przez komórki nowotworowe w trakcie leczenia. Zaproponowane w pracy podejście to próba rozwiązania obu tych problemów. Zastosowanie terapii celowanej z reguły zwiększa indeks terapeutyczny a zastosowanie antysensowych oligonukleotydów ma na celu obniżenie ekspresji genu Bcl 2, co powinno obniżyć oporność lekową. Oczekuje się, że połączenie technologii kierowanych nośników leków z terapią antysensową pozwoli znacząco poprawić efekt terapeutyczny mitoksantronu.

Stosowanie oligonukleotydów jako środków farmakologicznych wymaga pokonanie szeregu trudności wynikających z fizykochemicznych właściwości samej molekuly. Oligonukleotyd jest dobrze rozpuszczalną w wodzie silnie naładowaną molekułą. Powoduje to, że samodzielnie nie jest on w stanie pokonać bariery błon biologicznych, co jest warunkiem koniecznym osiągnięcia efektu terapeutycznego. Następnym istotnym ograniczeniem jest podatność kwasów nukleinowych na hydrolizę enzymatyczną w płynach fizjologicznych. Dodatkowo, stosowana samodzielnie terapia antysensowa może okazać niewystarczająca aby powstrzymać rozwój nowotworu. Rozsądne więc wydaje się zastosowanie terapii kombinowanej poprzez połączenia efektu zahamowania ekspresji odpowiedniego białka z działaniem chemioterapeutyka. Mgr Toporkiewicz zaproponowała podejście, w którym terapia antysensowa oraz chemioterapia przyjmują postać narzędzia farmakologicznego w postaci liposomowego nośnika. Nośnik ten w swoim jądrze zawiera zasocjowane z kationowym lipidzie oligonukleotydy. Agregat ten jest otoczony monowarstwą lipidową. Monowarstwa lipidowa składa się z lipidów oraz



ich pochodnych o takim składzie aby możliwe było wydajne dostarczenie oligonukleotydów do wnętrza komórki na drodze endocytotycznej a specyficzność komórkową całego konstruktu uzyskuje się poprzez zastosowane przeciwciała do powierzchniowego bio-markera CD20. Założono, że obniżenie ekspresji genu Bcl2 obniży oporność lekową komórek nowotworowych na działanie mitotraksonu, który może być przenoszony w tym samym nośniku co oligonukleotydy.

Osiągnięcie założeń projektu w postaci funkcjonalnego preparatu farmakologicznego wymagało przeprowadzenia złożonego procesu badawczego, który w ogólności można podzielić na trzy etapy; badania przedkliniczne obejmujące wytworzenie preparatu w skali laboratoryjnej oraz pokazania jego skuteczności na modelach biologicznych obejmujących hodowle komórkowe oraz testy *in vivo* na zwierzętach. W przypadku pomyślnego zakończenia tego wstępnego etapu podnoszona jest skala wytwarzania preparatu, który następnie poddany jest testom klinicznym. Praca doktorska mgr Toporkiewicz obejmuje badania w zakresie badań przedklinicznych z pominięciem analiz chemicznych oraz podniesienia skali wytwarzania.

Przeprowadzenie badań przedklinicznych dla preparatów tak złożonych jak liposomowe nośniki leków wymaga stosowania złożonego warsztatu doświadczalnego. Realizacja poszczególnych zadań badawczych wymagała wykorzystania wiedzy i metod z zakresu genetyki, biologii molekularnej, farmakologii oraz fizykochemii agregatów makromolekularnych. Mgr Toporkiewicz w przedstawionej rozprawie doktorskiej zaprezentowała wyniki doświadczeń pokazujących, że zaprojektowany i wytworzony w skali laboratoryjnej, immunoliposom jest stabilny w czasie, chroni oligonukleotydy przed działaniem enzymów, jest specyficznych wobec komórek nowotworowych, posiada niską toksyczność, redukuje ekspresję genu Bcl2 oraz hamuje wzrost guzów nowotworowych w modelach mysich. Wszystkie, zaprezentowane w rozprawie etapy badawcze składają się na bardzo poprawny i kompletny proces obejmujący znaczą część badań wymaganych w fazie badań przedklinicznych.

Z merytorycznego punktu widzenia zaprezentowane wyniki badań oceniam jako bardzo wartościowe a opracowany preparat liposomowy za bardzo interesujący. Jednakże przedstawiony preparat nie jest jeszcze gotowy do dalszych etapów badań, przeciwnie do tego co twierdzi autorka, między innymi, w streszczeniu pracy doktorskiej. Wynika to z faktu, że większość przedstawionych wyników nie spełnia kryteriów stawianych przez instytucje odpowiedzialne za rejestrację leków. Niemniej prezentowane wyniki można z pewnością jako „*proof of principle*”.

Mgr Toporkiewicz podzieliła swoją rozprawę doktorską, zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, na cztery części: wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Całość została opatrzona streszcze-



# Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370, Wrocław

tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

niem, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, zdefiniowaniem celów pracy, bibliografią i wnioskami.

**Wstęp** obejmuje obszerny opis nowotworów układu krwiotwórczego, stosowanych terapii opartych o kwasy nukleinowe, z obszernym opisaniem stosowanych formulacji, oraz, co uważam za bardzo cenne, farmakokinetyczne uzasadnienie dla stosowania technologii kierowanych nośników w terapiach opartych o molekuly, których cele znajdują się w lub w pobliżu jądra komórkowego.. We wstępie zabrakło mi opisu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw powstawania agregatów supramolekularnych oraz opisu uwarunkowań farmakokinetycznych wynikających z lokalizacji komórek docelowych. To ostatnie jest konsekwencją nieprecyzyjnie zdefiniowanym celem terapii. Nie jest jasne czy celem terapii są komórki krwi obwodowej czy układ krwiotwórczy. Brak tego opisu powoduje, że logika przeprowadzonych prac badawczych miejscami jest niespójna, na przykład w uzasadnieniu wyboru mysiego modelu nowotworu.

**Cele pracy** zarówno cel ogólny, tzn. „... stworzenie liposomowego nośnika antysensowych oligonukleotydów anti-Bcl2 przeznaczonego do celowanej terapii nowotworów krwi pochodzenia B-komórkowego” jak i cele cząstkowe są przedstawione w stosownym rozdziale na stronie 46 i 47.

**Materiały i Metody** napisane są zgodnie z zasadami obowiązującymi w literaturze fachowej. W tej części pracy przedstawiono opisy wszystkich stosowanych metod doświadczalnych. Jednakowoż w wielu przypadkach brak jest odnośników literaturowych co oznacza, że autorka sama te metody opracowała. W takim przypadku brak jest miejscami istotnych informacji np. dotyczących poziomu odzysku oznaczanych substancji (np. Oznaczanie zawartości kwasu nukleinowego w liposomach na stronie 55). W materiałach nie pokazano także w jaki sposób kalibrowane były metody oraz czy była ilościowa kontrola składu liposomów wykorzystywanych do doświadczeń poza założeniem, że skład lipidowy liposomów nie ulega zmianie w trakcie ich przygotowywania. Uważam, że w pracy, poza statystyczną analizą danych, powinien znaleźć się opis wymagań jakościowych stawianych argumentom doświadczalnym przez instytucje dopuszczające leki do obrotu.

**Wyniki** są przedstawione i omówione w taki sposób, że poszczególne etapy badań układają się w zwartą i logiczną merytorycznie całość zgodną z powszechnie uznanym schematem badań przedklinicznych.

Duże wrażenie robią dane uzyskane w badaniach biologicznych tzn: selektywność immunoliposomów względem komórek Daudi (CD20+) oraz HeLa (CD20-) (Rycina 20), wpływ liposomów na poziom apoptozy w komórkach Daudi (Rycina 21) czy wyniki badań in vivo (Rozdział 6).



# Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370, Wrocław

tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

**Dyskusja** uzyskanych wyników jest przeprowadzona bardzo obszernie i to do tego stopnia, że czasami odnosi się wrażenie, że ponownie prezentowane są wyniki. Dyskusja zawiera częste powoływanie się do aktualnych danych literaturowych co pokazuje, że autorka dobrze orientuje się w aktualnym stanie wiedzy w zakresie zastosowania kierowanych nośników leków do terapii genowych. W dyskusji brakuje mi elementów polemicznych z prezentowanymi w literaturze poglądami oraz ustosunkowanie się do kwestii spełnienia przez prezentowane wyniki wymagań stawianych przez dokumentację CTD.

W **bibliografii** wskazano pozycje literaturowe, które w sposób zadowalający wspierają prezentowane w pracy tezy i stwierdzenia. Na uwagę zasługuje fakt, że większość danych literaturowych pochodzi z okresu po 2010 roku co pokazuje, że autorka uwzględniła bardzo aktualny stan wiedzy.

Podsumowując, uważam, że mgr Monika Toporkiewicz wykonała i zaprezentowała obszerny materiał doświadczalny obejmujący większość etapów badań przedklinicznych dla nowej postaci leku. Szczegółowe opisanie procesu wytwarzania w skali laboratoryjnej, częściowa charakterystyka chemiczna i fizykochemiczna otrzymanych agregatów oraz badania na hodowlach komórkowych i *in vivo* na modelach mysich stanowią zwartą i merytorycznie spójną całość.

Zaprezentowane badania pokazują, że Pani mgr Monika Toporkiewicz jest sprawnym eksperymentatorem, który opanował technologię przygotowywania złożonych preparatów farmakologicznych, potrafi stosować szereg zaawansowanych technik badawczych, oraz uzyskać, zestawić i zaprezentować złożone dane doświadczalne. Zaprezentowane wyniki w znacznej części nie były nigdzie wcześniej publikowane co dowodzi ich oryginalności. Tym samym mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Moniki Toporkiewicz spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych wraz z późniejszymi poprawkami, stanowi oryginalną pracę naukową, wykazuje wiedzę teoretyczną autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Moniki Toporkiewicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Prof. dr hab. inż. Marek Langner