

Wrocław 10.10.2014

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Meissner p.t.

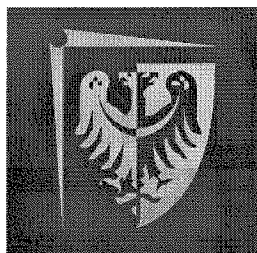
„Liposomowa postać kompleksu oligonukleotyd-polietylenoimina w celowej terapii ludzkich nowotworów krwi”

Współczesne terapie farmakologiczne to złożone technicznie i metodologicznie zabiegi medyczne posługujące się złożonymi narzędziami molekularnymi i supramolekularnymi, których zastosowanie pozwala na modyfikacje wybranych procesów fizjologicznych wybranych typów komórek w wybranym miejscu organizmu. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska prezentuje wyniki prac badawczych dotyczących złożonego układu supramolekularnego będącego elementem złożonej strategii farmakologicznej. Powszechnie uważa się, że takie terapie farmakologiczne będą powszechnie stosowane w niedalekiej przyszłości. Zatem tematykę przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej uznać należy za ważną i wpisującą się w najnowsze trendy nowoczesnej farmakologii.

Strategia farmakologiczna zaprezentowanej w pracy opiera się na połączeniu klasycznej terapii (mitoksantron) z terapią genetyczną polegającą na ograniczeniu ekspresji białka (Bcl 2) biorącego udział w rozwoju oporności lekowej przez komórki rakowe. Celem przedstawionych badań jest opracowanie supramolekularnego nośnika dla oligonukleotydów będących elementem terapii skojarzonej. Spodziewanym wynikiem takiego podejścia jest podniesienie skuteczności chemoterapeutyku poprzez modyfikację wybranych procesów fizjologicznych komórek nowotworowych (indukowanie apoptozy).

Aby taka strategia była skuteczna w praktyce należy pokonać szereg trudności wynikających z fizykochemicznej natury oligonukleotydu oraz procesów metabolicznych odpowiedzialnych za niską skuteczność systemowej podaży kwasów nukleinowych. Mgr Meissner zaprojektowała nośnik w taki sposób, że zasocjowane z kationowym polimerem (polietylenoiminą) oligonukleotydy, są opłaszczane dwuwarstwą lipidową osłoniętą kowalencyjnie związanym z powierzchnią lipidów polimerem (glikolem polietylenowym). Komórkową specyficzność nośnika uzyskała poprzez związanie z powierzchnią agregatu przeciwciała, w tym przypadku przeciwciała ontygenu CD20, specyficznego dla komórek Daudi oraz dla limfocytów izolowanych z krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowaną białaczką.

Każdy element utworzonego agregatu ma do spełnienia specyficzną funkcję powodując, że zachowanie się nośnika w organizmie można w ograniczonym stopniu przewidzieć. Skompleksowanie oligonukleotydów z kationowym polimerem pozwoliło na neutralizację oddziaływań elektrostatycznych kwasów nukleinowych i uformowanie zwartych nanoagregatów. Otoczka lipidowa chroni oligonukleotydy przed degradacją enzymatyczną, a związany z



Politechnika Wroclawska

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

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

27

powierzchnią liposomu hydrofilowy polimer utrudnia oddziaływania z białkami osocza chroniąc w ten sposób agregat przed układem immunologicznym. Natomiast rozmiary agregatów (ok. 100 nm – 150 nm) umożliwiają wniknięcie do docelowej tkanki powodując adsorpcję na powierzchni komórek oraz wprowadzenie przenoszonego kwasu nukleinowego do cytoplazmy komórek docelowych.

Poważnym wyzwaniem stojącym przed mgr Meissner w trakcie realizacji projektu było jego wysoce interdyscyplinarny charakter. Realizacja poszczególnych zadań badawczych wymagało wykorzystania wiedzy i metod z zakresu genetyki, biologii molekularnej, farmakologii, fizykochemii agregatów makromolekularnych, biofizyki, fizjologii i patofizjologii. Pani Meissner podjęła się tego złożonego projektu i w sposób zadowalający osiągnęła wytyczone cele.

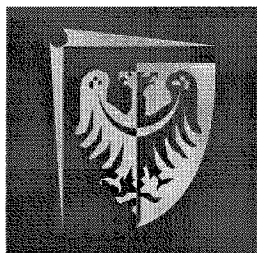
Merytoryczna ocena rozprawy.

Mgr Meissner postawiła sobie za cel skonstruowanie agregatu zawierającego oligonukleotydy zdolnego dostarczyć je do komórek nowotworowych oraz wykazać, że połączenie terapii genetycznej z klasyczną farmakologią podniesie skuteczność leczenia. Mgr Meissner skonstruowała złożoną, wielofunkcyjną strukturę molekularną uformowaną z lipidów, polimerów i nukleotydów. Preparat został dobrze scharakteryzowany i funkcjonalnie zoptymalizowany poprzez dobranie odpowiednich proporcji tworzących go składników. Wyznaczono rozkład rozmiarów agregatów oraz ich powierzchniowy potencjał elektrostatyczny. Charakteryzowane były także etapy pośrednie agregatu powstające w trakcie procesu wytwarzania. Uzyskane struktury były oceniane pod kątem stabilności, oddziaływania z elementami krwi oraz toksyczności hemolitycznej. Następnie agregaty były badane pod kątem selektywności komórkowej oraz wydajności w supresji wybranych genów poprzez ilościowe oznaczenie białka będącego przedmiotem interwencji. W końcu agregat testowany był na modelowych guzach rakowych indukowanych w myszach. Wykazano, że agregaty akumulują się w guzie oraz, że zastosowanie terapii skojarzonej pozwoliło, przynajmniej w jednym przypadku, na całkowite zahamowanie wzrostu guza nowotworowego.

W trakcie badań mgr Meissner stosowała zróżnicowany warsztat badawczy poczynając od analiz fizykochemicznych, poprzez metody biochemiczne, genetyczne, biologii molekularnej, oceny skuteczności na hodowli komórkowych a kończąc na badaniach farmakokinetycznych prowadzonych na modelach zwierzęcych. Wszystkie etapy badawcze składają się na bardzo poprawny i kompletny proces badawczy obejmujących cały zakres badań wymaganych w fazie badań przedklinicznych. Pokazuje to, że autorka rozprawy doskonale porusza się w złożonym obszarze technologii kierowanych nośników leków.

Podsumowując, zaprezentowane wyniki badań oceniam jako nowe i bardzo wartościowe. Opinia moja jest potwierdzona przez dorobek autorki, w którym, poza publikacjami i doniesieniami konferencyjnymi, znajduje się dwa zgłoszenia patentowe.

Techniczna ocena rozprawy.



Politechnika Wroclawska

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

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

27

Mgr Meissner podzieliła swoją rozprawę doktorską, zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, na cztery części: wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Całość została opatrzona streszczeniem, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, zdefiniowaniem celów pracy oraz bibliografią. Zastrzeżenie może budzić brak zwięzłego podsumowania.

Wstęp jest napisany przejrzysto i wyczerpująco. Przedstawia on dotychczasowy stan wiedzy dotyczących zarówno rodzajów terapii genetycznych jak i obszernym opisem stosowanych obecnie nośników kwasów nukleinowych.

We wstępie zabrakło mi trochę opisu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw powstawania agregatów supramolekularnych. Brak ten skompensowany jest do pewnego stopnia przez przejrzyste schematy przedstawiające hipotetyczne (oczekiwane) struktury tworzonych agregatów (strony 54 i 66).

Interesującym zabiegiem było zaprezentowanie rozdziału, w którym przedstawiono sekwencję badań wymaganych do opracowania nowej terapii farmakologicznej (Rozdział 4). Rozdział ten porządkuje i organizuje treści znajdujące się w następnych rozdziałach. W opisie procesu opracowywania nowego leku (rozdział 4) pojawiło się kilka nieścisłości takich jak np. stwierdzenie, że patent jest wymagany aby rozpocząć badania kliniczne, czy niezręczne opisanie badań klinicznych.

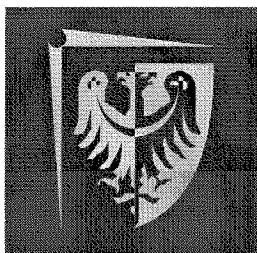
Cele pracy są zdefiniowane poprawnie i układają się w logiczną całość, jednakże zaprezentowanie ich w formie nieprzerwanego tekstu zamazuje przekaz.

Materiały i Metody napisane są zgodnie z zasadami obowiązującymi w literaturze fachowej i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Wyniki są przedstawione i omówione w sposób przejrzysty a poszczególne etapy badań układają się w zwartą i logiczną całość zgodnie z przedstawionym wcześniej schematem badań przedklinicznych. W jednym z przypadków prezentowane wyniki budzą zastrzeżenia. Chodzi o prezentowane rozmiary agregatów. Podanie wartości średniej wraz z odchyleniami (np. strona 67) oczywiście nie budzi zastrzeżeń brak jest jednak informacji dotyczących parametru pdi. Parametr ten mówi jak jednorodna populacyjnie była próbka.

Duże wrażenie robią dane zaprezentowane na Rysunku 33 gdzie pokazano, że rozwój chłoniaka Burkitta został praktycznie zahamowany po zastosowaniu liposomowej postaci oligonukleotydów anty bcl-2 podawanych samodzielnie oraz w połączeniu z mitoksantronem. Szkoda, że nie dyskutowano tego wyniku szerzej.

Dyskusja uzyskanych wyników jest przeprowadzona logicznie i przekonująco co spowodowane jest częstym odnoszeniem się do najnowszych danych literaturowych. Interesującą częścią dyskusji jest wskazanie, że zaproponowana w pracy konstrukcja nośnika dla oligonukleotydów jest na tyle elastyczna, że będzie ją można zaadoptować do leczenia nowotworów innych niż białaczka czy to poprzez zmianę rodzaju oligonukleotydu czy to poprzez zmianę znajdującego się na powierzchni agregatu przeciwciała.



Politechnika Wroclawska

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław

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

27

W bibliografii wskazano pozycje literaturowe, które w sposób zadowalający wspierają prezentowane w pracy tezy i stwierdzenia. Na uwagę zasługuje fakt, że prawie 60 % danych bibliograficznych jest z okresu po 2010 roku co pokazuje, że autorka uwzględniła aktualny stan wiedzy dla szybko rozwijającej się technologii kierowanych nośników leków.

Niewielka ilość błędów edycyjnych, powtórzeń, nieścisłości, pominięć czy zwykłych pomyłek nie umniejsza wysokiej wartości zaprezentowanej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, uważam, że mgr Justyna Meissner wykonała i zaprezentowała wartościowe wyniki prac badawczych i rozwojowych w zakresie badań przedklinicznych dla nowoczesnej postaci leku. Szczegółowe opisanie procesu wytwarzania w skali laboratoryjnej, wszechstronna charakteryzacja chemiczna i fizykochemiczna otrzymanych agregatów oraz badania na hodowlach komórkowych i *in vivo* na modelach mysich stanowią zwartą i kompletną całość.

Zaprezentowane badania pokazują, że Pani mgr Justyna Meissner jest sprawnym eksperymentatorem, który opanował technologię przygotowywania złożonych preparatów farmakologicznych, potrafi stosować szereg zaawansowanych technik badawczych, uzyskać i zaprezentować różnorodne dane doświadczalne a na ich podstawie wyciągnąć merytorycznie uzasadnione wnioski. Tym samym mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Justyny Meissner spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym 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 Justyny Meissner do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Prof. dr hab. inż. Marek Langner