



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominika Lipki,
p.t. „Nowe liposomowe formułacje antybiotyku przeciwnowotworowego z
grupy antracyklin”,
wykonanej w Zakładzie Lipidów i Liposomów
Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej pana mgr Dominika Lipki celem badań było opracowanie metody otrzymywania innowacyjnych liposomowych formułacji przeciwnowotworowego antybiotyku – epirubicyny.

Tematyka badań podjętych przez Doktoranta jest niezwykle aktualna i dotyczy dwóch istotnych i obiecujących form terapii onkologicznej: zastosowania nanonośników leków przeciwnowotworowych oraz terapii celowanej molekularnie.

W dziedzinie chorób nowotworowych nanotechnologia stwarza możliwości rozwoju metod terapii pod względem redukcji toksyczności i poprawy skuteczności leczenia. Piśmiennictwo donosi o badaniach, w których cząsteczki leków stosowanych w chemioterapii (paklitakselu, epirubicyny, docetakselu, metotreksatu) były łączone z nanonośnikami - liposomami lub nanocząstkami polimerowymi. Niektóre z tych preparatów zostały zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych (FDA). Najbardziej znane z nich to DOXIL i Abraxane. Wyjątkowe właściwości fizyczne nanocząstek (wielkość, ładunek, biokompatybilność, rozpuszczalność) mogą być wykorzystane do wydłużania okresu cyrkulacji leku, co z kolei może doprowadzić do zwiększonej akumulacji w obszarze nowotworowym. Układ naczyniowy obszaru nowotworowego rozwija się szybko i jest bardziej

porowaty od układu naczyniowego zdrowej tkanki, co pozwala makromolekułom i nanocząstkom selektywnie wnikać do przestrzeni śródmiąższowej nowotworu.

Cytowane we wstępie dysertacji dane dotyczące wspomnianej powyżej tematyki stanowiły dla Doktoranta przesłankę do podjęcia badań nad liposomowymi formułacjami epirubicyny, przeciwnowotworowego antybiotyku z grupy antracyklin. Zgodnie z założeniem Doktoranta zamknięcie tego związku w liposomach powinno obniżyć jego toksyczność, poprawić parametry farmakokinetyczne (zmniejszyć objętość dystrybucji) oraz zwiększyć efektywność terapeutyczną. Warto podkreślić, że osiągnięcie założonego celu utrudniał charakter chemiczny i własności fizykochemiczne epirubicyny, niemniej zastosowana przez Autora strategia badań dała pozytywne efekty, potwierdzone w dalszym wynikami testów biologicznych.

Recenzowana dysertacja ma postać 140 stronicowej rozprawy o klasycznym układzie, zawierającej streszczenie, część teoretyczną, cel pracy, opis badań własnych, wyniki eksperymentów i ich analizę, dyskusję oraz podsumowanie. Zaprezentowany przegląd piśmiennictwa jest szeroki i obejmuje ponad 180 pozycji, w wysokim procencie opublikowanych w okresie ostatnich 5-10 lat. Stanowi on czytelną podstawę dla postawionej przez doktoranta hipotezy badawczej.

We wstępie, stanowiącym część teoretyczną rozprawy, Autor przedstawił przegląd nanonośników leków przeciwnowotworowych, przybliżając równocześnie zjawisko leżące u podstaw ich wykorzystania – efekt EPR. Odrębny podrozdział poświęcił liposomom, metodom zamykania cząstek (leków) w liposomach oraz aktywnemu ukierunkowaniu liposomów – co stanowiło przedmiot jego badań własnych. Dużą uwagę Doktorant poświęcił antybiotekom antracyklinowym, w tym epirubicynie, analizując jej aktywność, toksyczność, charakter chemiczny i własności fizykochemiczne mające wpływ na proces zamykania w liposomach. Reasumując, część teoretyczna pracy uzasadnia celowość podjęcia badań nad otrzymaniem liposomowych formułacji epirubicyny.

Badania własne przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Dominika Lipki są niezwykle rozległe i trudne do podsumowania w krótkiej formie recenzji. Można je podzielić na dwa etapy, biorąc pod uwagę cel i stosowaną metodykę. Celem ich było odpowiednio:

- otrzymanie, optymalizacja i analiza własności nowej liposomowej formułacji epirubicyny
- otrzymanie, optymalizacja i analiza własności ukierunkowanej liposomowej formułacji epirubicyny.

Pierwszy etap pracy polegał na opracowaniu i charakterystyce nowej metody aktywnego zamykania w liposomach związków o lekko zaznaczonych właściwościach lipofilowych i słabym charakterze zasadowym. Opracowana przez Doktoranta metoda oparta była na gradiencie kwasu askorbinowego oraz askorbinianu amonu. Uzyskana została bardzo dobra wydajność zamykania, przy korzystnym stosunku lek : lipid. Scharakteryzowana została również kinetyka zamykania epirubicyny w liposomach. Opracowane liposomowe formułacje zostały przebadane pod względem stabilności, zgodnie z wytycznymi ICH i wykazały wysoką stabilność. Stan fizyczny leku wewnątrz liposomów Doktorant określił metodą dichroizmu kołowego oraz mikroskopią Cryo-TEM. Badania tego typu dla epirubicyny nie były dotąd opisane. Stan fizyczny antybiotyku w liposomach zamkniętych za pomocą gradientu kwasu askorbinowego i askorbinianu amonu Doktorant porównał z lekiem zamkniętym gradientem siarczanu amonu oraz wersenianu amonu. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić istotne różnice stanu fizycznego epirubicyny zamkniętej w liposomach metodą opracowaną przez Doktoranta oraz z wykorzystaniem innych gradientów.

Niezwykle interesujące są wyniki badań aktywności cytotoksycznej *in vitro* otrzymanych liposomowych formułacji epirubicyny, oraz porównanie jej z aktywnością innych formułacji liposomowych tego leku. Badania wykazały zdecydowanie wyższą aktywność opracowanej przez Doktoranta formułacji. Pozwoliły również skorelować aktywność formułacji ze stanem fizycznym zamkniętego w liposomach leku. Również przeprowadzone na mysim modelu nowotworu piersi badania porównawcze aktywności leku zamkniętego w liposomach z aktywnością wolnej epirubicyny wykazały znacznie zwiększoną aktywność przeciwnowotworową formułacji liposomowej. Pierwszy etap niezwykle obszernych badań zakończony został wyznaczeniem profilu farmakokinetycznego liposomowej formułacji epirubicyny i porównaniem z profilem wolnej antracykliny. Reasumując, pierwszy etap badań zakończył się pełnym sukcesem: wyniki badań eksperymentalnych potwierdziły słuszność postawionej przez Doktoranta hipotezy badawczej.

Drugi etap pracy obejmował opracowanie ukierunkowanej liposomowej formulacji epirubicyny. Aktywne ukierunkowanie nośnika, mające na celu m. innymi zwiększenie biodostępności, zostało przeprowadzone przez wiązanie do powierzchni liposomów wiązaniem amidowym kwasu foliowego. O wyborze tego typu linkera zdecydowała m. in. jego stabilność oraz mała masa cząsteczkowa. Doktorant przeprowadził optymalizację liposomowej frakcji epirubicyny ukierunkowanej za pomocą kwasu foliowego. Badania optymalizowanych formulacji wykazały istniejące zależności pomiędzy ilością kwasu foliowego związanego na powierzchni liposomów a stabilnością oraz aktywnością cytostatyczną *in vitro*. Interesujące okazały się wyniki badań porównawczych lokalizacji leku w komórkach przy zastosowaniu formulacji ukierunkowanej i nieukierunkowanej. Ukierunkowanie liposomów powodowało akumulację leku w jądrach komórkowych, co zdaniem Autora odpowiadało za zwiększenie działania przeciwnowotworowego ukierunkowanej formulacji i docelowo być może pozwoli na uniknięcie efektu oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Podobnie jak w przypadku formulacji nieukierunkowanej, dla ukierunkowanej kwasem foliowym formulacji liposomowej epirubicyny Doktorant wyznaczył profil farmakokinetyczny preparatu.

Badania nad ukierunkowaną formulacją liposomową wykonane przez Doktoranta w drugim etapie pracy mają nieco węższy zakres od badań pierwszego etapu i zapewne będą w przyszłości kontynuowane.

Reasumując, warte podkreślenia są zalety, zarówno poznawcze jak i aplikacyjne recenzowanej pracy:

1. Opracowano nową efektywną metodę zamykania leku przeciwnowotworowego w liposomach.
2. Otrzymano stabilną, wysoce aktywną liposomową postać leku przeciwnowotworowego – epirubicyny, o znaczącym potencjale komercjalizacyjnym.
3. Opracowano ukierunkowaną formulację liposomową tego samego leku o podwyższonej aktywności.
4. Aplikacyjność podjętej tematyki i potencjał kliniczny otrzymanych formulacji potwierdzono badaniami analitycznymi i częściowymi badaniami przedklinicznymi.

Uwagi krytyczne i zagadnienia wymagające dodatkowego wyjaśnienia przez Doktoranta w mojej opinii są nieliczne. Dyskusyjne jest zawarte w podsumowaniu

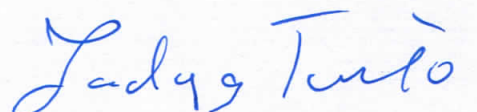
stwierdzenie, że „dokonano badań nowej formułacji do etapu badań przedklinicznych”, sugerujące, że takie badania zostały w pełni przeprowadzone. Pojęcie „badania przedkliniczne” jest bardzo pojemne, zakres tych badań jest szerszy od przeprowadzonego przez Doktoranta. Obejmuje np. również wstępne prace nad formą leku.

Praca zawiera błędy edycyjne, przykładowo numery strony podane w spisie treści nie są tożsame z numerami w tekście, nie wszystkie użyte w tekście skróty są rozwinięte w liście skrótów, obecne są w tekście błędy literowe, np. „*encasulation efficiency*” zamiast „*encapsulation efficiency*”. Są to jednak drobne błędy, w żaden sposób nie pomniejszające wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że mgr Dominik Lipka przedłożył wartościową pracę, wnoszącą poważny wkład do wiedzy na temat nanonośników leków przeciwnowotworowych oraz terapii celowanej molekularnie. Doktorant wykazał się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, zaprojektowania i przeprowadzenia złożonych eksperymentów, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. W mojej ocenie recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie pana mgr Dominika Lipki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę obszerność i wysoki poziom recenzowanej pracy składam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Warszawa 15 grudnia 2015


dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (2) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl