dr hab. Teresa Basińska
Dział Polimerów
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź
tel.: (42) 6803235
e-mail: basinska@cbmm.lodz.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Darii Lipowskiej-Kur

wykonanej w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu

Degradowalne nanocząstki polimerowe jako nośniki substancji terapeutycznych

Przedstawiona do recenzji praca, wykonana pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Dworaka, oraz dr inż. Róży Szwedy jako promotora pomocniczego, ma układ klasyczny i zawiera 143 strony. Praca jest podzielona na 9 części, ułożonych w bardzo logiczny i konsekwentny sposób, z których, do głównych należy zaliczyć wstęp, cel badań, przegląd literatury z zagadnień omawianych w pracy, część eksperymentalną z dokładnym opisem przeprowadzonych doświadczeń oraz aparatury badawczej stosowanej w pracy, omówienie i dyskusję wyników badań, wnioski i podsumowanie. Celem pracy doktorskiej było opracowanie metod otrzymywania polimerowych nośników doksorubicyny (leku stosowanego w terapii przeciwnowotworowej) z wykorzystaniem termoczułych polimerów.

Pragnę jednocześnie nadmienić, że w zespole Pana Profesora Dworaka prowadzone są od wielu lat prace eksperymentalne poświęcone otrzymywaniu i badaniom właściwości polimerów o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych, a także prace zmierzające do praktycznego wykorzystania polimerów w medycynie. Na szczególną uwagę zasługują badania relacji między strukturą makrocząsteczek a termoczułością i możliwość kontroli temperatury przejścia fazowego w zależności od składu i stężenia polimeru lub kopolimeru. W tego typu badaniach bardzo przydatne są rozwijane w zespole od wielu lat kompleksowe metody i techniki badawcze oraz ogromne doświadczenie całego zespołu badawczego w zakresie metod syntezy i charakterystyki polimerów. Wiadomo, bowiem, że prace nad polimerami i materiałami z nich otrzymywanymi, zwłaszcza o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym lub terapeutycznym stanowią duże wyzwanie i wymagają wszechstronnej interdyscyplinarnej wiedzy z zakresu chemii, biologii i medycyny. Połączenie bardzo dobrego, uznanego warsztatu z umiejętnością przeprowadzania cykli doświadczeń prowadzących do rozwiązania postawionego problemu stanowią mocne podstawy do uzyskania bardzo rzetelnej wiedzy

na temat polimerowych nośników substancji biologicznie aktywnych. Pracę doktorską p. Darii Lipowskiej-Kur czyta się bardzo dobrze, jest napisana w bardzo spójny, uporządkowany i konsekwentny sposób. Tok myślenia jest łatwy do śledzenia, wnioski i komentarze są zgodne z zaprezentowanymi wynikami materiału doświadczalnego. Muszę przyznać, że cel pracy, realizowanej przez Doktorantkę był bardzo ambitny. A Doktorantka – p. Lipowska-Kur postawiła sobie bardzo trudny cel do osiągnięcia, mianowicie, opracowanie nośnika leku p/nowotworowego, doksorubicyny, złożonego z mieszaniny usieciowanych kopolimerów, wrażliwych na temperaturę oraz efektywnie wiążącego i uwalniającego (w miejscu docelowym – czyli w obrębie nowotworu) doksorubicynę w sposób kontrolowany. Badania na temat nośników leków p/nowotworowych są prowadzone od wielu lat w wielu ośrodkach na świecie. Jednak, do tej pory bardzo niewiele jest doniesień, na temat wprowadzonych do terapii p/nowotworowych polimerowych nośników leków, które powodowałyby przy pełnej kontroli farmakodynamiki leku, zmniejszenie częstotliwości podawania leku oraz zmniejszenie lub ograniczenie ubocznych działań leku w całym organizmie. Ogromne znaczenie w dążeniu do rozwiązania tego problemu mają badania potencjalnych polimerowych nośników leków. Na podstawie istniejącej wiedzy, a także licznych prac przeprowadzonych w zespole p. prof. A. Dworaka, na temat polimerów termoczułych i ich właściwości temperaturowo-zależnych, na szczególną uwagę zasługują mezoglobule. Cząstki te tworzą się w wyniku agregacji makrocząsteczek termoczułego polimeru z niższą krytyczną temperaturą rozpuszczania (ang. LCST), gdy zostanie przekroczona temperatura przejścia fazowego. Temperatura ta zależy od właściwości polimeru lub kopolimeru (m.in. struktury, obecności podstawników hydrofilowych lub hydrofobowych, topologii makrocząsteczek, stężenia). Wadą mezoglobul jest brak ich trwałości poniżej temperatury przejścia fazowego, co ogranicza ich zastosowanie w roli nośników substancji biologicznie aktywnych.

Pani mgr Lipowska-Kur zaproponowała cykl badań zmierzający do opracowania metody otrzymania trwałych mezoglobul z poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) i ich pochodnych, ze związaną kowalencyjnie doksorubicyną, których rozpad, a następnie, uwolnienie substancji czynnej nastąpiłby w sposób kontrolowany. Zaplanowała, że polimerowy termoczuły nośnik zostanie otrzymany metodą termicznej koagregacji mieszaniny polimerów lub kopolimerów, których makrocząsteczki zawierałyby związaną kowalencyjnie doksorubicynę. Dodatkowo, kopolimery zostaną zmodyfikowane w taki sposób, aby mogły być usieciowane, a następnie, po wprowadzeniu w okolice nowotworu „łączniki" makrocząsteczek mogły łatwo ulegać powolnej, ale kontrolowanej hydrolizie. Lek będzie uwalniany z mezoglobul przez hydrolizę wiązania chemicznego doksorubicyna-polimer, stosując odpowiednie pH środowiska lub enzym. Wiadomo, bowiem, że pH tkanki nowotworowej różni się od pH zdrowej tkanki organizmu.

W początkowym etapie badań, pani mgr Lipowska-Kur zsyntetyzowała serię poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych), mianowicie, poli(metakrylan glikolu dietylenowego), chlorowodorek poli(metakrylanu 2-aminoetylu), poli((metakrylan glikolu dietylenowego)-ko-(metakrylan 2-aminoetylu) z różną zawartością chlorowodorku metakrylanu 2-aminoetylu oraz oznaczyła liczbę grup

aminowych w polimerach. W celu uzyskania polimeru zdolnego do sieciowania, grupy amoniowe zostały zmodyfikowane następnie, do grup azydkowych stosując procedurę zaproponowaną przez Kitamurę. Z kolei grupy aminowe innej frakcji poli(metakrylanu glikolu dietylenowego) były zmodyfikowane chloromrówczanem propargilu do grup karbaminianowych. Na każdym etapie syntezy lub ewentualnej modyfikacji, wszystkie kopolimery zostały dobrze scharakteryzowane za pomocą widm 1H NMR, FTIR.

Następnie, zbadała termoczułość makrocząsteczek poprzez pomiary zależności transmitancji roztworów polimerów względem temperatury zmętnienia otrzymanych polimetakrylanów, w wypadku grzania stopniowego. Z wcześniejszych doświadczeń było wiadomo, że wielkości mezoglobul otrzymanych w wyniku grzania szokowego i stopniowego różnią się w sposób zdecydowany. Temperatury zmętnienia zostały oznaczone dwiema metodami, za pomocą spektroskopii UV-Vis i za pomocą dynamicznego rozpraszania światła w zakresie stężeń polimerów 0,1-1,0 g/L. Badania umożliwiły ocenę wpływu obecności hydrofilowego komonomeru, charakteru grup funkcyjnych oraz stężenia makrocząsteczek na wartości ich temperatur zmętnienia.

Kolejny etap prac poświęcony został badaniom agregacji poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) do mezoglobul. W badaniach p. Lipowska-Kur stosowała pomiary pozornego promienia hydrodynamicznego cząstek, które tworzyły się z makrocząsteczek, w zakresie temperatur 15-50 ^{o}C. Doktorantka porównała uzyskane pomiary promienia hydrodynamicznego, gdy roztwór polimeru był ogrzewany w sposób stopniowy i szokowy. W wypadku ogrzewania szokowego wielkości cząstek były znacznie mniejsze, co wskazuje, że wielkości mezoglobul mogą być kontrolowane przez zastosowanie różnych protokołów ogrzewania roztworu polimeru.

Pani mgr Lipowska-Kur zbadała, w kolejnym etapie pracy, możliwość (odwracalnego) usieciowania polimerów zawierających grupy azydkowe i propargilowe w różnych stosunkach wagowych oraz sam proces tworzenia się mezoglobul z dwóch różnych makrocząsteczek. Ta procedura została zaproponowana w celu uzyskania stabilnych mezoglobul, trwałych w temperaturach poniżej temp. zmętnienia. Na podstawie wyników badań DLS i UV stwierdziła, że w procesie stopniowego ogrzewania roztworów mieszaniny polimerów najpierw ulegają agregacji łańcuchy zawierające ugrupowanie propargilowe, które jest bardziej hydrofobowe, po czym, na zagregowanych makrocząsteczkach adsorbują się łańcuchy zawierające grupy azydkowe. Doktorantka stwierdziła, że w wyniku grzania stopniowego uzyskane obiekty mają budowę rdzeń-powłoka, natomiast w wypadku grzania szokowego uzyskiwała znacznie mniejsze cząstki o homogenicznej morfologii.

W celu wytworzenia cząstek będących nośnikami leku, makrocząsteczki polimerów wymagały usieciowania. Pani Magister związała makrocząsteczki zawierające grupy azydkowe i propargilowe stosując reakcję cykloaddycji Huisgena. W efekcie tego procesu uzyskała trwałe mezoglobule, wrażliwe na zmianę temperatury przez zmianę promienia hydrodynamicznego w zależności od temperatury. Wielkości mezoglobul zostały potwierdzone za pomocą obrazów fazowych z mikroskopu sił atomowych (AFM).

Następny etap prac był poświęcony badaniu procesu degradacji cząstek wskutek hydrolizy wiązania karbaminianowego. Autorka pracy stwierdziła, że czas procesu hydrolizy usieciowanych mezoglobul był zależny od pH i był najkrótszy w przypadku środowiska zasadowego o pH=10. W wyniku hydrolizy uzyskuje się makrocząsteczki o strukturze odbiegającej od pierwotnej, gdyż jeden z łańcuchów zawierał grupy aminowe, natomiast drugi – pierścień triazolowy i grupę hydroksylową.

Na podstawie rezultatów badań przeprowadzonych we wcześniejszych etapach, w finalnym etapie pracy został otrzymany i scharakteryzowany trójskładnikowy kopolimer – przygotowany jako nośnik doksorubicyny - który składał się z 3 komonomerów: metakrylanu glikolu dietylenowego, metakrylanu oligoetylenowego i chlorowodorku metakrylanu 2-aminoetylu, którego grupy zostały zmodyfikowane do grupy azydkowej lub prop-2-yn-1-ylokarbaminianowej.

Jednocześnie Pani magister przeprowadziła modyfikację doksorubicyny, poprzez modyfikację grupy aminowej w reszcie cukrowej leku do grupy N-(prop-2-yn-1-ylokarbaminianowej), po czym doksorubicynę skoniugowała z łańcuchem polimerowym zawierającym grupy azydkowe. Efektywność przyłączenia leku została określona na podstawie absorbancji koniugatu i porównania z absorbancją N-(prop-2-yn-1-ylokarbaminianu) doksorubicyny z krzywej kalibracji, przy λ=500 nm. Rezultaty wskazują, że wydajność reakcji przyłączenia wyniosła 85 % i średnio 6 cząsteczek doksorubicyny zostało przyłączonych do jednej makrocząsteczki.

W wypadku wszystkich uzyskanych terpolimerów zbadano zależność transmitancji od temperatury przy stosowaniu grzania stopniowego, oznaczono także temperatury zmętnienia roztworów mieszanin badanych polimetakrylanów a także, zawierających związaną doksorubicynę, przy stężeniach w zakresie 0,1-1,0 g/L. Wyniki wskazywały na niewielki udział doksorubicyny w obniżeniu temperatury zmętnienia koniugatu terpolimeru z lekiem, oraz zależności transmitancji lub intensywności rozpraszania w funkcji temperatury świadczyły o jednym przejściu fazowym, a oznaczone rozkłady wielkości cząstek podczas grzania szokowego były wąskie.

Terpolimery mieszane, o odpowiednio dobranych stosunkach i zawierające grupy azydkowe i propargilowe oraz zawierające związaną pochodną doksorubicyny zostały usieciowane, zgodnie z opracowaną procedurą. Wynikiem przeprowadzonego procesu było otrzymanie mieszanych mezoglobul, które zachowały swoją stabilność przy cyklicznym grzaniu, a wielkości mezoglobul oznaczone metodą dynamicznego rozpraszania światła były potwierdzone za pomocą obrazów CryoTEM.

Cykl badań przeprowadzonych przez panią mgr Lipowską-Kur doprowadził do otrzymania stabilnych mezoglobul złożonych z makrocząsteczek, zawierających grupy chemiczne zdolne do wzajemnego usieciowania, wrażliwych na zmiany temperatury oraz zawierających kowalencyjnie związaną doksorubicynę. Cząstki zostały scharakteryzowane, przez określenie ich wielkości i rozkładów wielkości przy cyklicznym grzaniu i chłodzeniu roztworów z cząstkami, różnymi metodami (DLS, AFM, CryoTEM), w różnych temperaturach, oznaczony został stopień spęcznienia usieciowanych mezoglobul. Cykl badań poświęconych uwalnianiu substancji aktywnej oraz hydrolitycznemu

rozpadowi mezoglobul był etapem finalnym i niestety, nie zakończył się pełnym powodzeniem. Mianowicie, doksorubicyna była uwalniana z nośnika polimerowego ze stosunkowo małą wydajnością bez udziału enzymu pronazy. Enzym ten wspomaga hydrolizę wiązania karbaminianowego i zwiększa efektywność uwalniania leku. Natomiast należy podkreślić, że usieciowane cząstki zawierające doksorubicynę zachowały stabilność przez długi czas, co może mieć znaczenie przy przechowywaniu nośnika z lekiem.

Podsumowując realizację zadań wykonanych w ramach pracy doktorskiej, jednym z najważniejszych osiągnięć było opracowanie metod prowadzących do uzyskania stabilnych, usieciowanych cząstek, zbudowanych z luźno upakowanych łańcuchów polimerowych, ze związaną kowalencyjnie doksorubicyną. Jestem przekonana, że niniejsza praca stanowi dobry wstęp do dalszych badań nad polimerowymi nośnikami leków przeciwnowotworowych. Doceniam dużą wiedzę, umiejętności eksperymentalne i umiejętności w zakresie interpretacji uzyskanych wyników, doskonałą dokumentację wyników oraz zaangażowanie doktorantki p. Lipowskiej-Kur w opisane w pracy cykle badań i uzyskane rezultaty. Uważam, że praca wnosi cenny wkład w poznanie procesów tworzenia nowego typu cząstek polimerowych (usieciowanych mezoglobul) oraz wiązania i uwalniania substancji biologicznie aktywnych. Nabyta wiedza i umiejętności podczas wykonywania pracy doktorskiej będą stanowić mocną podstawę do opracowania nowych nośników polimerowych leków, skutecznie wiążących i uwalniających, w sposób kontrolowany, związki aktywne, które, miejmy nadzieję, znajdą praktycznie zastosowanie.

Z racji pełnienia funkcji recenzenta, pozwolę zwrócić uwagę na wielokrotnie występujący termin „nanocząstki", który w większości wypadków został użyty nieprawidłowo, gdyż zgodnie z nomenklaturą IUPAC cząstki o średnicach poniżej 100 nm są nazwane nanocząstkami, natomiast, większe, o średnicach powyżej 100 nm są mikrocząstkami.

Zagadnienia, które nie były poruszane w pracy, ale które bezpośrednio dotyczą problemów omawianych w rozprawie, i które, mam nadzieję, będą przedyskutowane podczas obrony pracy, są następujące: (i) czy istnieją informacje na temat działania terapeutycznego (aktywności) doksorubicyny, po reakcji modyfikacji struktury, (ii) czy zawartość doksorubicyny w usieciowanych cząstkach jest wystarczająca, aby nośnik z zawartym lekiem mógł stanowić dawkę terapeutyczną leku, która może być jednorazowo podana pacjentowi?

Rozprawa zawiera liczne, bardzo pozytywne elementy, takie jak aktualność tematyki, biorąc pod uwagę względy poznawcze i możliwe praktyczne zastosowania, klarowne zaznaczenie celu badań oraz doskonałe i logicznie uporządkowane udokumentowanie badań, stanowi wkład w rozwój badań na temat polimerowych nośników leków. Poza tym, pani mgr inż. Lipowska-Kur jest współautorką 3 publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu ogólnoświatowym (jedno z wysokim IF) oraz 14

doniesień konferencyjnych, a także popularyzatorką nauki wśród dzieci i młodzieży, prowadząc zajęcia chemiczne.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty ocenianej pracy, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Darii Lipowskiej-Kur spełnia warunki przewidziane w ustawie o stopniach i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem pozwalam sobie zaproponować Wysokiej Radzie, aby na podstawie przedłożonej rozprawy, dopuścić panią mgr inż. Darię Lipowską-Kur do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 14.12.2018.