



dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni
Katedra i Zakład Technologii Postaci leku
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a; 50-556 Wrocław
tel. (71) 784 03 24, faks (71) 784 03 17
bozena.karolewicz@umw.edu.pl

Wrocław, 30 listopada 2021 r.

OCENA
rozprawy doktorskiej mgr farm. Żanety Słyk
pt. „Hydrożelowe formułacje rAAV w terapii genowej nowotworów mózgu”

**wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Macieja Meleckiego –
Kierownika Zakładu Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego WUM**

Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Lokalizacja, masa guza, stopień złośliwości, obecność bariery krew-mózg często ograniczają możliwości stosowanych terapii chirurgicznych, farmakologicznych, radioterapii i skłaniają do poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów mózgu, często do zastosowania w skojarzeniu. Miejscowo stosowana postać leku jest postrzegana jako nieinwazyjna forma podania substancji w terapii nowotworów, szczególnie w sytuacji terapii pacjentów z nowotworami mózgu, których zlokalizowanie, rozległość zmiany ogranicza przeprowadzenie operacji chirurgicznej, a obecność restrykcyjnej bariery krew-mózg czyni nieefektywnym stosowanie konwencjonalnej chemioterapii ogólnoustrojowej. Opracowywanie postaci leku dla miejscowego podania nowych substancji o potencjale przeciwnowotworowym, w tym z wykorzystaniem egzogennej sekwencji nukleotydowej jest ważnym, rozpatrywanym kierunkiem rozwoju technologii nośników substancji czynnych w terapii adjuwantowej nowotworów zlokalizowanym w OUN.

W tym kontekście mgr farm. Żaneta Słyk, w swojej rozprawie na stopień doktora nauk farmaceutycznych, zajęła się opracowaniem hydrożelowych stałych formułacji jako nośnika dla rekombinowanych wektorów wirusów związanych z adenowirusami (rAAV), w celu otrzymania formułacji genowej do stosowania miejscowego, wraz z oceną aktywności transdukcyjnej rAAV *in vitro*. Jest to niewątpliwie zagadnienie naukowe aktualne i istotne w kontekście rozwoju nowych możliwości terapeutycznych i nowych nieinwazyjnych dróg podawania sekwencji nukleotydowej w terapii nowotworów.

Metodyka badawcza (założenia, cel, metody)

Celem głównym recenzowanej pracy było opracowanie receptury i ocena formułacji hydrożelowych z wektorami rAAV do stosowania miejscowego w neurochirurgii. Etapy realizacji celu obejmowały:

- opracowanie składu i optymalizację otrzymywania nośników hydrożelowych na bazie żelatyny,
- ocenę właściwości fizyko-chemicznych i wybór optymalnych dla aplikacji miejscowej nośników,
- ocenę profilu uwalniania wektorów wirusowych z wyselekcjonowanych matryc w warunkach *in vitro* wobec preparatu handlowego - gąbki żelatynowej z rAAV,
- ocenę wydajności transdukcji komórek mózgu i glejaka ludzkiego Hs683 wybranymi serotypami wektorów rAAV w warunkach *ex vivo* i *in vitro*,
- ocenę aktywności transdukcijnej formułacji genowych w warunkach *ex vivo* i *in vitro* oraz wpływu matryc na wydajność transdukcji komórek 3 wybranych linii nowotworów, w tym glejaka ludzkiego.

W pracy w ocenie formułacji hydrożelowych otrzymywanych przez dehydratację bądź żelowanie w zależności od składu przyjęto kryteria oceniające ich cechy organoleptyczne tj. elastyczność, grubość, łatwość wyjęcia z formy i możliwość wprowadzania wektora rAAV, pozwalające na wybór optymalnego do aplikacji rAAV nośnika. W ocenie matryc żelatynowych z wektorami rAAV prowadzono:

- uwalnianie wektora rAAV2 w płytkach 24-dółkowych i jego oznaczenie z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz ilościowego PCR (qPCR);
- ocenę transdukcji mózgów mysich w warunkach *ex vivo*,
- ocenę ich aktywności transdukcijnej *in vitro* na 3 liniach komórkowych oraz ich wpływu na wydajność wprowadzenia transgenu *in vitro* w 1 linii komórkowej z wykorzystaniem metody mikroskopii fluorescencyjnej,
- ocenę ich wpływu na żywotność komórek 3 linii w teście MTT z wykorzystaniem spektrofotometru płytkowego.

W przypadku wspomnianej oceny transdukcji mózgów mysich czy oceny aktywności transdukcijnej *in vitro*, izolowane w pierwszym przypadku DNA lub w drugim DNA i RNA analizowano w ocenie jakościowo-ilościowej spektrofotometrycznie, DNA amplifikowano w reakcji PCR i oceniano jakościowo w metodzie elektroforezy w żelu agarozowym.

Zastosowane metody zostały prawidłowo dobrane, zapewniając poprawną realizację i ocenę zakładanych celów.

Struktura rozprawy

Praca obejmuje ogółem 162 strony włączając wykaz skrótów, piśmiennictwo, spis rycin, tabel i streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Rozprawa podzielona jest na XI rozdziałów, w tym I rozdział Wstęp, obejmujące odpowiednio: 2 podrozdziały stanowiące 40-stronicowe teoretyczne, obszernie wprowadzenie do zagadnień dotyczących postaw molekularnych i strategii terapeutycznych terapii genowych oraz omawiających podstawy anatomiczno-funkcjonalne OUN i mózgu jako celu terapii chorób, w tym nowotworów (sumarycznie stanowiące około 25% całości pracy). Kolejno rozdziały II-XI opisują: cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję wyników, wnioski (sumarycznie 74 stron, około 45% całości pracy), spis piśmiennictwa, spis tabel i rycin oraz wspomniane streszczenia w dwóch wersjach językowych. Zaprezentowany materiał został zilustrowany 28 rycinami oraz 21 tabelami.

Wykorzystane piśmiennictwo

Autorka przytoczyła obszerny wykaz 320 pozycji piśmiennictwa, na które się powołuje, obejmujących publikacje naukowe (306 pozycji, ponad 95% cytowanego w pracy piśmiennictwa), publikacje książkowe (8 pozycji), dane z baz rejestrujących badania kliniczne (2 pozycje) i strony towarzystw naukowych (1 pozycja), pracę magisterską (1 pozycja), dane odnośnie terapii genowych z agencji rejestracji (1 pozycja), dane z rejestrów medycznych (1 pozycja) odzwierciedlające na dzień dzisiejszy stan wiedzy z zakresu poruszanego w dysertacji zagadnienia. W części teoretycznej I. Wstęp obejmującej 2 obszernie porozdziały Doktorantka przeprowadziła gruntowną analizę źródeł, przytaczając 236 pozycji piśmiennictwa. Piśmiennictwo dotyczące podejmowanej tematyki wydane po roku 2014 stanowi ponad 40% ogółu cytowanego piśmiennictwa (131 przytaczane pozycje), co przy dynamice regulacji i obiegu wiedzy w nauce z obszaru technologii postaci leku jest w pełni zadowalającym wskaźnikiem.

Szczegółowa ocena merytoryczna poszczególnych części rozprawy

Rozdział I. stanowiący wstęp do recenzowanej dysertacji doktorskiej zawiera wszystkie istotne elementy części teoretycznej rozprawy, co wprowadza czytającego w zagadnienie terapii genowej i klasyfikuje strategie terapeutyczne, charakteryzując jako nośniki transgeny wektory niewirusowe i wirusowe, w szczególności rekombinowane wektory wirusów z adenowirusami (rAAV), drogi podania czy nośniki genowe dostępne w postaci roztworów,

zawiesin, emulsji, hydrożeli i opatrunków żelowych. Tak szerokie ujęcie tematu z uwzględnieniem podstaw anatomiczno-fizjologicznych OUN jako docelowego miejsca działania leku, charakterystyki chorób neurodegeneracyjnych i nowotworów, stanowiących wyzwanie w terapii i efektywnym transporcie leków do miejsca działania w tkance mózgu, pozwala czytającemu zapoznać się z motywami pracy i genezą podjętego tematu.

W rozdziale II. Doktorantka po teoretycznym wprowadzeniu wskazuje na główne cele badawcze pracy.

W następnym rozdziale III. zostały wymienione materiały, wykorzystywane w pracy sprzęt, opisane metody badań z wykorzystaniem zwierząt i hodowli komórkowych, preparatyka i ocena projektowanych formułacji oraz metody badań transdukcji mózgowi myszy wektorami aAAV w warunkach *ex vivo* i wydajności transdukcji przez serotypy rAAV linii komórkowej glejaka Hs683. Rozdział opisuje kolejno uwalnianie wektorów rAAV z opracowanych matryc i opatrunku odniesienia oraz ocenę ich aktywności na 3 wybranych liniach komórkowych w czasie. Dalej w pracy Doktorantka oceniała wpływ opracowanych matryc bez wektorów rAAV na wydajność wprowadzenia transgeny do wybranej linii komórkowej oraz na żywotność komórek 3 wytypowanych linii. W ostatniej części badań opisano metodę izolacji DNA z transdukowanych wektorami rAAV mózgowi myszy, izolację DNA i RNA z osadów komórkowych wybranych 3 linii, ich ocenę jakościową i ilościową oraz ocenę wydajności transdukcji komórek 3 linii oraz mózgowi myszy.

Rozdział IV. przedstawia w pierwszej części podsumowanie optymalizacji warunków otrzymywania i oceny formułacji genowych oraz zebrane w formie tabel i rycin dane badawcze, które zdecydowały o wyborze formułacji docelowo dla wprowadzenia wektorów rAAV. W kolejnej części rozdziału przedstawiono wyniki oceny transdukcji mózgowi myszy przez wektory rAAV po zastosowaniu miejscowym matrycy z rAAV w warunkach *ex vivo*. Kolejno czytelnie w formie rycin przedstawiono wyniki uwalniania wektorów rAA z projektowanych matryc, ocenę wpływu matryc na wydajność transdukcji wektorami i na żywotność komórek 3 wybranych linii.

Rozdział V. „Dyskusja” zawiera autorskie podsumowanie badań wraz z odniesieniami do bieżącego piśmiennictwa światowego. Doktorantka w tej części podjęła dyskusję naukową wraz ze wskazaniem korzyści wynikających ze stosowania miejscowej terapii genowej jako terapii adjuwantowej w odniesieniu do klasycznych metod terapii glejaka. Na podkreślenie zasługuje opracowanie przez Doktorantkę i wyselekcjonowanie na podstawie oceny właściwości formułacji hydrożelowych na bazie żelatyny z wektorami rAAV i kompleksowa ocena wydajności transdukcji zarówno w warunkach *ex vivo*, jak i *in vitro*. Wyższa wydajność

transdukcji *in vitro* przy zastosowaniu nośnika w porównaniu do wprowadzania wektorów bezpośrednio do hodowli, wskazuje na dojrzałość naukową Autorki i kompleksowe podejście do tematu, skutkujące w efekcie rozwiązaniem problemu badawczego.

Rozdział VI. zawiera 5 wniosków wyprowadzonych z przeanalizowanego materiału badawczego, dotyczących wyboru składu i metody otrzymywania nośnika hydrożelowego na bazie żelatyny dla wektorów rAAV oraz wyselekcjonowano wektory o najwyższej aktywności transdukcyjnej w warunkach *ex vivo* i *in vitro* i potwierdzono potęgowanie aktywności transdukcyjnej rAAV po zastosowaniu w opracowanych matrycach.

Rozdziały kolejno VII, VIII, IX, X i XI stanowią piśmiennictwo, spis tabel, rycin, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim

Po lekturze rozprawy, w mojej ocenie wskazane cele rozprawy zostały osiągnięte i podsumowane przez Doktorantkę w formie wniosków.

Język i formalna strona rozprawy

W przedłożonej rozprawie doktorskiej brak konsekwencji w stosowaniu zasad dla odsyłaczy bibliograficznych, Doktorantka dowolnie stosuje skróty bądź pełne nazwy czasopism, na które się powołuje np. (the New England of Medicine, Discovery medicine, itd.). Znaleziono omyłkowo nieliczne usterki językowe (omyłka w zdaniu „Cele stosowania są różne, uzależnione od...” zamiast „Cele ich stosowania są różne, uzależnione od...” str. 27; omyłki we fragmencie tekstu na str. 27; niejasne użycie „Stosowane samodzielnie, nie powstrzymują krwawienia z dużej i średniej, wydajniejsza jest...” zamiast „Stosowane samodzielnie, nie powstrzymują krwawienia z dużej i średniej rany, wydajniejsza jest...” str. 28; omyłka w zdaniu „..., który jest odpowiedzialny za fagocytarne produktów rozpadu tkanki nerwowej...” str. 29; użycie sformułowania w celu pracy „... do stosowania w nowotworach mózgu.” zamiast „... do stosowania w terapii nowotworów mózgu.”), świadczą o gruntownej analizie i korekcie tekstu.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość merytoryczną pracy, z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na tylko na nieliczne kwestie w części badawczej:

- błąd w zdaniu „Początkowo (3 h inkubacji) obserwowane jest pierwsze maksimum uwalniania, po czym następuje stopniowy spadek wykrywanych serkwencji *itr* w analizowanym materiale, aż do osiągnięcia minimum uwalniania w 24 h inkubacji, a z danych na rycinie 14 wynika, iż dla formułacji F4 minimum osiągane jest po 48 h inkubacji.
- użycie niefortunnego socjolektalnego określenia „worteksowanie”;

- warto byłoby również w pracy zamieścić schemat przebiegu prowadzonych prac badawczych, co ułatwiłoby wnioskowanie w toku analiz i dodatkowo podkreśliłoby szeroki zakres prac;

i przedstawić do dyskusji w toku obrony następujące zagadnienia:

1. Czy Doktorantka w toku badań prowadziła ocenę czasu rozmywania projektowanych matryc hydrożelowych, oceniając ich potencjalny czas rozpadu?
2. Czy Doktorantka na podstawie prowadzonych badań może określić stabilność wektorów rAAV w otrzymanej formulacji hydrożelowej? Czy prowadzono próby oceny stabilności wektorów rAAV w formulacji w czasie?

Wymienione do dyskusji kwestie w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej do oceny dysertacji, a jedynie wynikają z zainteresowania tematem i stanowią zagadnienia do rozważenia w kolejnych badaniach nad projektowaniem i oceną innowacyjnych formulacji do terapii genowych.

Wnioski i konkluzja końcowa

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- istotność i aktualność wybranej tematyki, w tym wypełnienie luki poznawczej w poszukiwaniu nowych możliwości aplikacji wektorów rAAV do zastosowań w terapii nowotworów mózgu,
- zaproponowanie biokompatybilnych formulacji na bazie żelatyny z rAAV, które w aplikacji *in vitro* pozwoliły na wydajne wprowadzenie wektorów do komórek glejaka ludzkiego;
- wskazanie na różnice w wydajności wprowadzania wektorów rAAV z opracowanej na bazie żelatyny formulacji do komórek w zależności od linii;
- wskazanie możliwości opracowania formulacji na bazie bioaktywnego polimeru z widoczną aktywnością transdukcyjną wprowadzonych do niej wektorów rAAV.

Reasumując oceniana rozprawa doktorska mgr farm. Żanety Słyk stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zagadnienie poszukiwania formulacji farmaceutycznych do zastosowań w terapii genowej nowotworów mózgu. Analizowane w dysertacji problemy badawcze są istotne i aktualne. Na podkreślenie zasługuje znaczenie uzyskanych wyników badań dla rozwoju prac badawczych ukierunkowanych na rozwój postaci leku do aplikacji miejscowej w terapii nowotworów, metody wskazywanej do zastosowania jako terapii

adjuwantowej w skojarzeniu z innymi rodzajami terapii tj. np. chirurgia i radioterapia, co stanowi dodatkowe korzyści rozpatrywane przy opracowaniu nowych strategii walki z chorobą. W mojej opinii praca wychodzi naprzeciw stawianym oczekiwaniom, iż opracowane i wyselekcjonowane formułacje w toku prac badawczych oraz po ocenie aktywności *in vivo*, stanowią istotny wkład w rozwój nowych możliwości aplikacji substancji w ukierunkowanej terapii miejscowej nowotworów OUN do zastosowań klinicznych.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Żanety Stryk do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
TECHNOLOGII POSTACI LEKU
Kierownik
Prof. dr hab. Ewa Karolewicz, prof. zw. em.

