

Warszawa, 2017.06.12

Prof. dr hab. n. farm. Iwona Wawer
Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Ewy Skorupskiej

pt. "Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach
enkapsulacji leków w mezoporowatych nanokrzemionkach."

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy poprawy biodostępności substancji leczniczych poprzez umieszczenie ich w specjalnych nośnikach. Wybór tematu badań – z farmaceutycznego punktu widzenia - jest bardzo interesujący, jest to nie tylko ważny problem naukowy, ale również sprawa o istotnym znaczeniu dla przemysłu. Jak wiadomo, firmy farmaceutyczne przeznaczają duże środki na stworzenie nowych formułacji leków, gdyż wiele znanych i skutecznych substancji leczniczych słabo rozpuszcza się w wodzie. Lepiej rozpuszczalna i lepiej wchłaniana forma leku pozwala zmniejszyć dawkę, a co za tym idzie ew. skutki uboczne. Duże nadzieje są związane z nowymi nośnikami leków (Drug Delivery Systems, DDS), enkapsulacją substancji czynnej oraz jej mikronizacją.

Celem pracy było opracowanie metody umieszczenia leków w porach mezoporowatych nanokrzemionek, zbadanie właściwości fizykochemicznych takiego układu, szybkości uwalniania substancji leczniczej oraz możliwości zastosowania w technologii farmaceutycznej.

Przegląd piśmiennictwa pokazał, że w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie kokryształami farmaceutycznymi i ich potencjalnymi zastosowaniami. Jednak w momencie rozpoczynania pracy nie zbadano w sposób systematyczny materiałów nanokrzemionkowych (MSN) zawierających kokryształy leków. Głównym powodem były trudności z ich inkorporacją w MSN, a także brak opracowanych metod badawczych takiego układu. Do badań takich materiałów doskonale nadają się techniki spektroskopowe dostarczające informacji o fazie stałej, to głównie NMR, FT IR i Raman. Do pełniejszej charakteryzacji i wizualizacji materiałów potrzebne są też techniki krystalograficzne (XRD, PXRD) oraz mikroskopii elektronowej (TEM, SEM).

Pani Skorupska zastosowała wymienione techniki do badania enkapsulacji i uwalniania substancji leczniczych, co dowodzi zarówno dobrej orientacji w aktualnym stanie badań na świecie jak i znajomości potrzeb przemysłu farmaceutycznego.

Formalnie rozprawa podzielona jest na dwie części. Część pierwsza (str. 18-57) zawiera cel pracy, opis technik badawczych i badanych obiektów (mezoporowata nanokrzemionka, leki wybrane do inkorporacji, opis metod otrzymywania kokryształów) oraz wyniki badań własnych (inkorporacja leków i kokryształów, analiza szybkości uwalniania). Część druga zawiera 5 oryginalnych publikacji, w których pani Ewa Skorupska jest pierwszym autorem. Prace te zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych: Solid State NMR, Molecular Pharmaceutics (2 prace), Journal of Physical Chemistry C (2 prace). Ułatwia to pracę recenzenta rozprawy doktorskiej, bowiem materiał naukowy został przygotowany zgodnie z wytycznymi redakcji naukowych, zgodnie z dobrą praktyką pisanie publikacji, zawiera istotne dane eksperymentalne oraz nowe wyniki, ważne dla nauk farmaceutycznych – co ocenili profesjonalni recenzenci polecając te prace do druku.

W mojej ocenie, cykl pięciu prac stanowi interesujący i cenny wkład w badania nowych postaci leków w fazie stałej z innowacyjnym wykorzystaniem nowoczesnych metod spektroskopowych, zwłaszcza MAS NMR.

Nie wszystkie wykonane prace mogły być opisane w publikacjach o zasięgu międzynarodowym. Doceniam więc wkład pracy autorki w wykonanie części eksperymentalnej, tj. przygotowanie krzemionki, suszenie, stapianie, otrzymanie różnych kokryształów. Bez tej żmudnej pracy w laboratorium nie powstałyby obiekty badań, które pozwoliły na zaplanowanie i wykonanie efektywnych eksperymentów MAS NMR.

Bardzo ciekawą częścią pracy jest analiza efektów w widmach ^1H MAS i ^{13}C CPMAS NMR fazy stałej i możliwości wykorzystania tej techniki w badaniach nośników leków. Autorka dokonała przypisania sygnałów w widmach ^1H MAS zarejestrowanych przy dużej szybkości rotacji (VF, 60 KHz). W widmie czystego ibuprofenu widoczny jest sygnał grup OH przy 13 ppm, który maleje, lub nie pojawia się wcale, gdy lek znajduje się wewnątrz matrycy (wymiana protonów z grupami silanolowymi krzemionki). Całkowanie powierzchni sygnałów pozwoliło określić współczynnik wypełnienia lekiem porów nośnika (MCM-41). Bardzo interesującym eksperymentem było monitorowanie procesu usuwania leku z matrycy przez wodę i polarne rozpuszczalniki, takie jak etanol. Widma ^{13}C CPMAS NMR potwierdzają, że rozpuszczalniki te konkurują z lekami o miejsce wiązania wewnątrz

krzemionki. Przekonuje to, że metody „mokre”, wykorzystujące lek rozpuszczony w wodzie lub alkoholu nie pozwalają na efektywną inkorporację leku do tego nośnika. Stąd potrzeba rozwinięcia nowej metody (TSF), polegającej na wtopieniu substancji leczniczej w pory krzemionki. Metoda ta okazała się efektywna i zgłoszona została jako przedmiot patentu w 2017 r.

Innowacyjnym pomysłem było wykorzystanie kokryształów, które topią się w niższej temperaturze niż badana substancja lecznicza. Badania inkorporacji kokryształów w pory MSN rozpoczęto od otrzymania modelowego układu: kwas benzoesowy i pentafluorobenzoesowy. Kokryształ miał niższą temperaturę topnienia od czystych składników, udało się jego inkorporacja do nanokrzemionki, a dodatkowo obecność atomów fluoru pozwoliła na badania jego struktury i dynamiki molekularnej z wykorzystaniem ^{19}F MAS NMR. Intensywność sygnałów rotacyjnych dla kokryształu została wykorzystana do pomiarów ilościowych – stopnia napełnienia porów matrycy.

Kolejnym obiektem badawczym był naproksen, lek o wysokiej temperaturze topnienia, a odpowiednim koformerem okazał się pikolinamid. Jednak układ ten zawierał różne odmiany polimorficzne pikolinamidu, w zależności od sposobu otrzymywania kokryształu. Do charakterystyki struktury i oddziaływań molekularnych wiele informacji wniosły widma 2D NMR: korelacje ^1H - ^{15}N inv-HETCOR i ^1H - ^{13}C inv-HETCOR. Chociaż oba składniki kokryształu znajdowały się wewnątrz matrycy krzemionkowej, jednak podczas enkapsulacji następowała ich separacja.

Interesującym układem okazał się kokryształ nikotynamidu i ibuprofenu (w formie racemicznej i czystego enancjomeru S). Następowala w nim również separacja składników, a dodatkowo, inaczej wyglądało upakowanie i oddziaływania międzymolekularne dla racematu i czystej formy S. Nie tworzył się układ cyklicznego dimeru z dwoma wiązaniami wodorowymi ($\text{NH}\dots\text{O}$ i $\text{OH}\dots\text{N}$), ale wiązania typu $\text{OH}\dots\text{N}$.

W badaniach szybkości uwalniania substancji leczniczej z nośnika krzemionkowego zastosowano worki dializacyjne o określonych rozmiarach porów, przez które nie przedostawała się krzemionka. W roztworze można było oznaczyć stężenie substancji leczniczej metodą spektrofotometryczną lub/i analizując widma ^1H NMR rejestrowane dla cieczy. Zgadzam się z opinią, że spektroskopia NMR jest cenniejszym narzędziem w badaniach uwalniania leków niż tradycyjnie stosowana przez farmaceutów spektroskopia UV-VIS.

Drobne uwagi krytyczne: częściej stosowanym określeniem jest spektroskopia oscylacyjna (IR) zamiast „wibracyjnej” i „wibracji wiązań” (str. 25). Mówi się też o pasmach w podczerwieni, a nie „pikach” w widmie IR. Poprawnym terminem są „właściwości fizykochemiczne” a nie „własności” (str. 9, 32). „Cross-polaryzację” można zastąpić lepiej brzmiącą po polsku „polaryzacją skrośną”.

Podsumowując, uważam, że godny podkreślenia jest duży wkład pracy autorki w opanowanie i wykorzystanie różnorodnych technik badawczych służących poznaniu struktury leków w fazie stałej, zarówno substancji leczniczej jak i formy jej dostarczenia do organizmu. Zaproponowała ona zestaw eksperymentów, które powinny być wykonane celem scharakteryzowania nośników substancji leczniczych (DDS). Są w nim metody spektroskopowe (NMR, IR), dyfrakcyjne (XRD, PXRD), termograwimetryczne, mikroskopia elektronowa. W badaniach upakowania kryształu przydają się także metody obliczeniowe (GIPAW). Wyniki pracy dotyczące metod otrzymywania kokryształów mogą być wykorzystane praktycznie, do opracowania technologii otrzymywania tego typu materiałów o kontrolowanym składzie, przewidywalnych właściwościach fizykochemicznych i farmakokinetyce.

Walorem pracy jest zastosowanie różnych dostępnych metod badań strukturalnych i dobre scharakteryzowanie obiektu badań innowacyjnymi technikami NMR w fazie stałej. W moim przekonaniu praca zawiera istotne elementy nowości naukowej i stwarza bazę do dalszych, ciekawych interdyscyplinarnych badań materiałów ważnych dla farmacji.

Praca spełnia więc wszelkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Ewy Skorupskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jej pracy.

Wawer