

Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr Justyny Pacułt  
„Poprawa rozpuszczalności w wodzie oraz stabilności bikalutamidu w formie amorficznej -  
wykonanie stałych rozproszeń w matrycach polimerowych”

Praca doktorska pani mgr Justyny Pacułt jest oparta o cykl trzech spójnych tematycznie artykułów A1, A2 i A3, które dotyczą badań nad substancją leczniczą zwaną bikalutamidem (BIC). Praca powstała na Uniwersytecie Śląskim pod kierunkiem profesora Mariana Palucha a rolę promotora pomocniczego pełniła pani dr Marzena Rams-Baron. Badania, finansowane z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Symfonia 3, miały na celu poprawę biodostępności leku poprzez przygotowanie amorficznych mieszanin z wybranymi polimerami w odpowiednich proporcjach. Wyniki badań zostały opublikowane w *Molecular Pharmaceuticals* (IF = 4.556, 40 punktów ministerialnych, prace A1 i A2) oraz w *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (IF = 3,532, 100 punktów ministerialnych, praca A3). Prace są wieloautorskie (odpowiednio 9-, 5- i 9- cio autorskie). We wszystkich publikacjach mgr Justyna Pacułt jest pierwszym autorem, zaś autorem do korespondencji jest dr Marzena Rams-Baron. Zagadnienia przedstawione w pracach są ważne nie tylko jako ciekawy temat badawczy ale również ze względu na możliwość uzyskania amorficznego leku o efektywnym stężeniu w polimerze, znacznie lepiej rozpuszczalnego w organizmie pacjenta niż stosowana forma krystaliczna. W tym kontekście istotne były obserwacje dotyczące stabilności termodynamicznej amorficznego układu lek – polimer, a także mieszaniny bikalutamidu z innym lekiem, pod wpływem zmian temperatury i wraz z upływem czasu. Wyniki otrzymane przez panią Pacułt mają znaczenie nie tylko dla środowiska farmaceutów oraz pacjentów, zainteresowanych otrzymywaniem jak najmniejszej skutecznej dawki leku, ale są również istotne dla specjalistów w dziedzinie układów łatwo ulegających zeszkleniu.

Rozdział 1 pracy doktorskiej stanowi bardzo krótki zawierający cel pracy Wstęp, zakończony listą prac A1-A3 oraz prac B1 i B2, w których pani mgr Justyna Pacułt jest współautorem, a które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej, oraz uzupełniony listą międzynarodowych konferencji C1-C3, na których jej wyniki były przedstawiane - niestety wymieniono jedynie nazwy konferencji a brak tytułów referatów. Trzy paragrafy Rozdziału 2 są omówieniem wyników obserwacji metodą spektroskopii dielektrycznej dynamiki molekularnej leku również w mieszaninie z poliwinylpirolidynem (PVP) oraz badań stabilności kilku amorficznych mieszanin leku z polimerami o różnej długości łańcucha alkylowego, a także układu bikalutamid z innym lekiem o nazwie flutamid. Prezentacja zagadnień choć bardzo lakoniczna (8 stron, jeden rysunek z dwoma dodatkowymi panelami) jest ciekawa, napisana dobrym językiem i zachęca do lektury załączonych publikacji. Brakuje mi jednak rysunku ze schematem budowy chemicznej molekuł bikalutamidu i flutamidu oraz informacji o składowych momentu dipolowego tych molekuł. Rozdział 3 to kopie publikacji A1, A2 i A3 wraz z oświadczeniami mgr Justyny Pacułt o jej wkładzie pracy do poszczególnych publikacji oraz oświadczeniami promotora i promotora pomocniczego o przedyskutowaniu wyników i poprawie manuskryptów, a także o nadzorowaniu prowadzonych analiz przez promotora pomocniczego. W pracach A1-A3 pani mgr Justyna Pacułt ma w sumie 12 współautorów. Ich rola polegała na wykonaniu badań nad rozpuszczaniem leku w wodzie (dr A. Antosik-Rogóż, dr I. Szafraniec-Szczęsny i mgr M. Kurek) oraz badań rentgenowskich (dr inż. K. Jurkiewicz), a także pomiarów spektroskopowych w podczerwieni, badań kalorymetrycznych oraz pomiarów metodą PALS i

części badań technikami DSC oraz BDS badanych próbek (kolejno dr M. Dulski, J. Knapik-Kowalczyk, mgr inż. B. Chrzęszcz i mgr K. Chmiel) oraz na dyskusji wyników (prof. dr hab. R. Jachowicz i dr W. Jamróz). Rozdział 5 przedstawia krótkie półtorastronnicowe Podsumowanie otrzymanych rezultatów, co wobec tego, że prace dotyczą aktualnego zagadnienia a wyniki są ciekawe i opublikowane w dobrych czasopismach można nieco zaskakiwać. Rozdział 6 to Bibliografia, którą stanowi 36 pozycji literaturowych, w tym 7 prac dotyczących badań prowadzonych przez członków grupy profesora Palucha.

Chociaż liczne organiczne farmaceutyki łatwo przechodzą w nierównowagowy stan szklisty to terapia farmakologiczna nadal bazuje głównie na ich stabilnej formie krystalicznej i jest mało efektywna ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie. Jednym z głównych celów badań nad substancjami aktywnymi farmakologicznie jest poprawa stabilności i rozpuszczalności, aby lek spełniał normy farmaceutyczne. Jest to możliwe np. poprzez tworzenie stabilnych układów amorficznych w formie odpowiednich mieszanin leku i polimeru o wysokiej temperaturze przejścia szklistego, gdzie rekrytalizacja jest utrudniona. Wówczas, dzięki procesowi antyplastyfikacji spowalniana jest dynamika molekuł amorficznej mieszaniny co można rejestrować doskonale przy użyciu spektroskopii dielektrycznej. Sposób odpowiedzi układu na przyłożone zmienne pole elektryczne o częstotliwości z zakresu charakterystycznego dla tempa reorientacji molekuł leku pozwala wnioskować również o występowaniu/zaniku specyficznych oddziaływań pomiędzy molekułami mieszaniny co może sprzyjać efektowi stabilizacji fazy amorficznej dodatkowo. Używany w terapii antyandrogenowej enancjomer R racemicznej mieszaniny bikalutamidu (BIC), którą bada pani Pacuła, należy do klasy II systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej o słabej biodostępności. Rezultaty badań dielektrycznych i DSC dla czystego amorficznego BIC przedstawione w pracy A1 pokazują, że amorficzna forma BIC jest mało stabilna bo wykazuje silną tendencję do zimnej krystalizacji. Ta tendencja maleje po dodaniu polimeru PVP i dla mieszaniny lek-polimer w proporcji wagowej 2:1 otrzymano układ stabilny. Wzrostowi udziału polimeru w amorficznym układzie towarzyszy wyraźny wzrost wartości temperatury przejścia szklistego (od 325 K dla czystego BIC do 438 K dla czystego PVP) co stwierdzono metodą DSC. Uzyskano dobrą zgodność zależności  $T_g$  od składu mieszaniny z modelem Gordona-Tylora. Wykazano, że dodanie polimeru spowalnia dynamikę molekuł BIC, wpływa na spadek parametru tzw. kruchości (z wartości  $m=84$  do  $m=74$ ) i wydłuża okres stabilności przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej (z kilku dni dla czystego BIC do 2 miesięcy dla proporcji wagowych lek-polimer 10 : 1). Dla układu o proporcji 2:1 duże przewodnictwo elektryczne uniemożliwiło oszacowanie czasu relaksacji z samych obserwacji dielektrycznych ale dzięki wykorzystaniu wartości w temperaturze pokojowej z wyników DSC, stwierdzono że wzrost stabilności przewyższał 145 lat. Bardzo ciekawy wynik pochodzi z badań spektroskopowych w podczerwieni, które pokazały jak przy wzroście udziału składnika polimerowego w układzie wzrasta siła wiązań wodorowych pomiędzy molekułami BIC i PVP – stwierdzono przesunięcie maksimum pasma przypisanego drganiom grupy karbonylowej od  $1694\text{ cm}^{-1}$  do  $1650\text{ cm}^{-1}$ , rys.9. Ważnym rezultatem pracy A1 są wyniki pomiarów rozpuszczalności w wodzie badanych wcześniej układów. Stwierdzono, że różnica w rozpuszczalności formy krystalicznej i amorficznej czystego leku BIC jest nieznaczna (3.8 i 4.6 mg/ml). Dopiero dla układu BIC-PVP (2:1) rozpuszczalność się wyraźnie poprawia i po godzinie porcja rozpuszczonego leku jest blisko 8 razy większa niż uzyskana, gdy rozpuszczano lek w czystej postaci. Jest to bardzo obiecujące ze względu na przydatność mieszaniny BIC-PVP (2:1) do terapii.

Badania mieszanin lek - polimer kontynuowano dla próbek o 90% udziale leku, zmieniając w polimerze PVP długość łańcucha aby przeanalizować jak ich różna organizacja

przestrzenna wpływa na tendencję do krystalizacji czyli na stabilność próbek oznaczonych jako K10, K30 oraz K90. W pracy A2 pokazano, że obraz temperaturowej zależności dynamiki molekuł leku jest dla wszystkich mieszanin jednakowy. Równocześnie analiza izotermicznych obserwacji krystalizacji metodą dielektryczną pozwoliła stwierdzić, że jej przebieg jest najszybszy dla mieszaniny o najdłuższym łańcuchu polimerowym. Co ciekawe najmniejszą tendencję do krystalizacji wykazuje mieszanina oznaczona jako K30 o pośredniej długości łańcucha składnika polimerowego. Tym samym wykazano, że można poszukiwać takiej mieszaniny lek – polimer, aby łańcuch polimerowy był odpowiedni dla lepszej stabilności próbki. Ważnym elementem tej części badań pani Pacułt było wykorzystanie techniki anihilacji pozytonów do wyjaśnienia co jest przyczyną tego, że pewna długość łańcucha jest optymalna. Pokazały one korelację pomiędzy tendencją do krystalizacji układu lek-polimer a wielkością tzw. objętości swobodnej dla ruchów reorientacyjnych molekuł leku, która jest tutaj istotnym parametrem zależnym od organizacji łańcuchów. Rzeczywiście największą wartość tego parametru stwierdzono dla czystego leku, który łatwo krystalizuje - stabilny czysty polimer PVP30 o pośredniej długości łańcucha charakteryzuje najmniejsza wielkość objętości swobodnej. Praca przynosi ważny wniosek, że aby poprawić stabilizację układu należy zapewnić obniżenie wielkości objętości swobodnej.

W pracy A3 przedstawiono wyniki badań stabilności dla amorficznych mieszanin dwuskładnikowych bikalutamidu z flutamidem (FL,) oraz trójskładnikowych, dodatkowo z udziałem polimeru PVP lub MMA/EA jako stabilizatora. Metodą dyfrakcji rentgenowskiej sprawdzono, że żaden z leków w formie amorficznej nie spełnia norm farmaceutycznych: BIC przechodzi w formę krystaliczną po mniej niż 3 dniach, a FL po mniej niż 14 minutach. Pokazano wykorzystując techniki DSC i BDS, że co ciekawe krystalizacji można uniknąć tworząc mieszaninę amorficzną leków, w której udział FL (o niższej temperaturze zeszklenia niż BIC) nie przekracza 35%. Taki sam rezultat otrzymano poprzez sprawdzenie metodą zaproponowaną niedawno przez Krzysztofa Chmiela jaka stabilna forma amorficzna pozostaje po wytraceniu fazy krystalicznej z mieszaniny o większej zawartości FL. W pracy przedyskutowano mechanizm stabilizacji w takim układzie lek-lek w konfrontacji z podobnymi wynikami literaturowymi. Wykazano też jak zmiany składu mieszaniny FL-BIC wpływają na obraz dynamiki, czyli na tzw. mapę rejestrowanej relaksacji dielektrycznej, oraz na temperaturę zeszklenia (od 271 K dla czystego FL do 325 dla czystego BIC). Kolejnym krokiem w podjętych badaniach była charakterystyka stabilności i rozpuszczalności, gdy do mieszaniny leków BIC i FL dodano 30 % polimeru. Stabilną przez okres 182 dni mieszaninę trójskładnikową uzyskano po dodaniu PVP, stwierdzono też jej dobrą rozpuszczalność i odpowiednie tempo rozpuszczalności. Dla tego polimeru już wcześniej wykryto iż jest dobrym stabilizatorem leków. Natomiast dla MMA/EA nie udało się wyeliminowanie zimnej krystalizacji. Co ciekawe dla takiej mieszaniny zidentyfikowano dwa przejścia szkliste w temperaturach niższych niż  $T_g$  dla PVP.

Za najważniejsze dokonania przedstawione w pracy doktorskiej mgr Justyny Pacułt uważam:

1/ Przebadanie zmian dynamiki dla czystego BIC, a także dla mieszanin BIC-PVP oraz BIC-FL i procesu zimnej krystalizacji dla tych układów.

2/ Uzyskanie stabilnych amorficznych mieszanin BIC i PVP oraz BIC i FL, dwóch leków o podobnym działaniu, a także BIC, FL i PVP.

3/ Wykorzystanie techniki anihilacji pozytonów do oceny objętości swobodnej reorientujących molekuł leku i wyjaśnienia jaka jest optymalna długość łańcucha polimerowego w stabilnej mieszaninie lek-polimer o składzie odpowiednim do zastosowań farmakologicznych.

4/ Przeprowadzenie obserwacji stabilności próbek metodą dyfrakcji rentgenowskiej.

Publikacje A1-A3 są bardzo dobrze napisane, mają ciekawy obszerny wstęp i ważne konkluzje. Z obowiązku recenzenta zebrałam poniżej pewne niedociągnięcia zauważone w tekście pracy doktorskiej i publikacji A1-A3. Na przykład zamiast słowa „przekonwertowanie” może lepiej użyć słowa „przekształcenie”. Angielska nazwa techniki FT-IR to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (w pracy jest Transformer). W tekście pracy A1 brak jest objaśnienia skrótu „API” tam gdzie został on pierwszy raz użyty. W kilku miejscach zamiast „correlated” powinno być „related”. Na rysunku 6 zamiast skrótu HF powinien być skrót HN. Zamiast „70 different samples” powinno być „70 different substances”. Fraza „interaction between both materials” jest skrótem myślowym bo oddziaływania dotyczą molekuł. Podobna uwaga dotyczy frazy „molecular dynamics of BIC-PVP samples” w publikacji A2. W tekście pracy A2 napisano, że rysunek 3a przedstawia „dielectric loss spectra” podczas gdy pokazuje on „relaxation map”. Na rysunku 6 błędnie oznaczono wartość czasu relaksacji. W pracy A3 widać wyraźnie brak starannej redakcji tekstu. Zaskakuje, że przy wszystkich danych liczbowych pojawiają się znaki zapytania. Brak też czcionki z literami greckimi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$ ,  $\Delta$  oraz  $\varepsilon$ . Nie uwzględniono, że oznaczenia parametrów wielkości fizycznych powinny być pisane pochyłą czcionką.

Na zakończenie chciałam podkreślić, że w pracy doktorskiej mgr Justyny Pacułt otrzymano bardzo ciekawe wyniki, ważne zarówno w dziedzinie fizyki materii miękkiej jak i w aspekcie zastosowań farmaceutycznych. Zwraca uwagę wykorzystanie w badaniach szeregu metod eksperymentalnych. Przebadano stabilność i rozpuszczalność kilku wykonanych amorficznych mieszanin dwu i trójskładnikowych, wybierając kompozycje z dwóch rodzajów leków i dwóch polimerów. Metodą dielektryczną uzyskano informacje o zmianach temperaturowych dynamiki dipolowych molekuł leku i o procesie zimnej krystalizacji. Sprawdzone również poprawność tej techniki do oceny granicznej rozpuszczalności leku w polimerze w zaproponowany wcześniej sposób. Zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej pani mgr Pacułt zreferowała niezwykle jasno na Seminarium Oddziału Fizyki Materii Skondensowanej Instytutu Fizyki Jądrowej PAN.

Uważam, że przesłana do recenzji rozprawa czyni zadość wymogom stawianym pracom doktorskim i kieruję wniosek do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Justyny Pacułt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*M. Massalska-Arodź*

Prof. dr hab. Maria Massalska-Arodź

Kraków, 15 XII 2020