

STRESZCZENIE

Przemysł farmaceutyczny oraz metody leczenia chorób nowotworowych zwłaszcza na przestrzeni ostatnich lat dynamicznie się zmieniają, co wynika z potrzeby projektowania nowych, skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Bardzo obiecującym podejściem w leczeniu chorób nowotworowych jest antysensowa terapia genowa. Metoda ta, ze względu na niską toksyczność wobec zdrowych komórek oraz niwelowanie nie tylko objawów, ale również molekularnych przyczyn choroby, może stanowić przełom we współczesnej terapii nowotworów. Cząsteczki takie, jak antysensowe oligodeoksynukleotydy (asODN), krótkie interferujące RNA (siRNA, miRNA) lub oligonukleotydy o aktywności katalitycznej (rybozymy, DNAzymy) mogą znaleźć zastosowanie w obniżaniu poziomu ekspresji onkogenów w monoterapii lub w połączeniu z innymi środkami terapeutycznymi. Większość zdiagnozowanych przypadków przewlekłej białaczki limfatycznej oraz chłoniaków B-komórkowych związanych jest z nadekspresją antyapoptotycznego genu *BCL2*, co stanowi również przyczynę oporności na standardowo stosowane cytostatyki. Jest wysoce prawdopodobne, że poprzez obniżenie poziomu białka Bcl-2 uda się zapobiec rozwojowi nowotworu lub uwrażliwić komórki nowotworowe na indukcję apoptozy przez zestaw leków chemioterapeutycznych.

Dostarczenie terapeutycznego fragmentu DNA lub RNA do komórek docelowych w organizmie pacjenta wymaga zastosowania systemów wektorowych. W projekcie podjęto próbę konstrukcji preparatu o charakterze hybrydowym łączącym cechy liposomów oraz polimerów kationowych mającego zastosowanie jako nośnik leków genetycznych w terapii kierowanej. Opracowany wektor liposomowy zbudowany jest z rdzenia, który stanowią oligonukleotydy antysensowe kompleksowane z syntetycznym polikationem - polietylenoiminą (PEI), zamkniętego wewnątrz liposomu. Otoczkę lipidową zmodyfikowano za pomocą polietylenoglikolu (PEG), który częściowo zawierał grupy maleimidowe, do których kowalencyjnie przyłączono przeciwciała rozpoznające dobrze scharakteryzowany marker eksponowany na komórkach docelowych.

Konstrukcja nośnika jest na tyle elastyczna, że pozwala na wykorzystanie różnych typów leków genetycznych, jak asODN, siRNA, miRNA, DNAzym obniżających ekspresję dowolnych genów, jak również na zastosowanie dowolnych, humanizowanych przeciwciał

lub innych czynników białkowych kierujących do konkretnych komórek docelowych. Wybrany w projekcie pracy doktorskiej modelem jest konstrukcja nośnika zawierającego sekwencję asODN skierowaną przeciwko sześciu pierwszym kodonom mRNA antyapoptotycznego białka Bcl-2 w limfocytach B, nadekspresjonowanego np. w przypadkach ostrych białaczek limfatycznych i chłoniaków B-komórkowych. Jako cząsteczki kierujące zastosowano monoklonalne przeciwciała terapeutyczne rozpoznające antygen CD20. Opracowany nośnik liposomowy nazwano tL-P (targeted Liposomal coated Polyplex).

Podczas przeprowadzonych badań wykazano, że proponowana konstrukcja może zamykać duże ilości kwasów nukleinowych, jest stabilna podczas wielomiesięcznego przechowywania oraz zachowuje swoje parametry w obecności ludzkiej surowicy. Ponadto preparat wydajnie chroni zamknięty DNA przed degradacją przez enzymy nukleolityczne. Przyłączenie przeciwciał do powierzchni liposomów nie powoduje znaczących zmian podstawowych właściwości fizykochemicznych nośnika. Obserwacje mikroskopowe wykazały wyraźną różnicę w kierowaniu immunoliposomów do komórek posiadających na powierzchni marker CD20. Podobnie w badaniach z wykorzystaniem testu MTT oraz testu Alamar Blue wykazano cytotoksyczność immunoliposomów wobec komórek docelowych. Zaprojektowany nośnik liposomowy dzięki przyłączonym przeciwciałom działa więc selektywnie. Ponadto, preparat nie wykazuje aktywności hemolitycznej i charakteryzuje się niską nieswoistą cytotoksycznością.

Immunoliposomy tL-P efektywnie obniżają poziom białka Bcl-2 w ludzkich komórkach nowotworowych eksponujących na swej powierzchni antygen CD20. Spadek ekspresji genu docelowego jest ściśle związany z uwrażliwieniem komórki na proces programowanej śmierci zwanej apoptozą indukowaną przez cytostatyki. Podczas analiz cytotoksyczności obserwowano wysoką efektywność współdziałania preparatu z mitoksantronem w warunkach *in vitro*. Ponadto wyniki otrzymane z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wskazują na to, że opracowany preparat kierowany przeciwciałami indukuje apoptozę w komórkach docelowych prawdopodobnie poprzez obniżenie ekspresji genu *BCL2*.

Wykazano, że liposomowy nośnik tL-P charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwnowotworową w warunkach *in vivo*. Jako zwierzęta modelowe wybrano myszy szczepu NOD/SCID obciążone nowotworem indukowanym poprzez podskórne podanie komórek ludzkiego chłoniaka Burkitta, Daudi (CD20+). Wyniki analiz biodystrybucji wskazały, że immunoliposomy lokalizują się w obrębie guzów wywołanych podanymi komórkami, a

dodatek PEG zapewnia wydłużony czas przebywania nośników w krwiobiegu organizmów doświadczalnych. Podczas trwania eksperymentu obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu guzów w grupach myszy traktowanych immunoliposomami tL-P zawierającymi asODN "anty Bcl-2" osobno oraz w skojarzeniu z niskim stężeniem mitoksantronu.

Opracowany w tej pracy nowy, kierowany nośnik liposomowy, którego rdzeń stanowią kompleksy PEI-asODN może znaleźć potencjalne zastosowanie jako wektor w celowanej terapii genowej nowotworów. Biorąc pod uwagę powszechnie dostępne w literaturze informacje na temat ograniczeń związanych z zastosowaniem wolnych oligonukleotydów antysensowych w terapii *in vivo*, wszelkie próby wzmocnienia skuteczności ich działania mogą przyczynić się do rejestracji nowych form leków oraz rozwoju skuteczniejszych strategii terapeutycznych, a co za tym idzie, do postępu medycyny w walce z nowotworami.