

„Liposomowy nośnik leku genetycznego przeznaczony do celowanej terapii nowotworów krwi”

Streszczenie

Krwiotwórcze komórki macierzyste mogą nadmiernie proliferować w każdym z etapów procesu różnicowania prowadząc do ostrej lub przewlekłej formy nowotworu. Standardową metodą leczenia nowotworów układu krwiotwórczego jest chemioterapia, jednakże około 20% przypadków tych schorzeń pozostaje odporne na działanie cytostatyków. W komórkach przewlekłej białaczki limfocytarnej oraz chłoniaków B-komórkowych wykazano nadekspresję genu *BCL2* i stwierdzono zależność pomiędzy wysokim poziomem ekspresji tego genu, a niską skutecznością chemioterapii. W przypadku chorób, u podłoża których leżą zaburzenia genetyczne, coraz bardziej obiecującą metodą leczenia jest terapia genowa. W praktyce klinicznej najczęściej stosowane są metody wykorzystujące asODN, siRNA, shRNA, miRNA czy DNAazy, polegające na eliminacji lub przynajmniej ograniczeniu ekspresji genu odpowiadającego za powstanie choroby. Zatem potencjalną metodą leczenia nowotworów zależnych od nadekspresji *BCL2* może być zastosowanie leku genetycznego w postaci asODN, który przyłączając się do docelowego mRNA zaindukuje jego degradację. Jednakże do największych problemów ograniczających skuteczność terapii genowej zaliczamy efektywne dostarczenie leku genetycznego do miejsca docelowego. Lek genetyczny zasadniczo nie jest zdolny do pokonania bariery błony komórkowej. Istotnym problemem jest także wrażliwość „nagich” cząsteczek kwasów nukleinowych na enzymy nukleolityczne występujące w osoczu i innych płynach tkankowych. Wysoki wypadkowy ładunek ujemny kwasów nukleinowych promuje opsonizację i usuwanie z krwiobiegu przez makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego. Konieczne jest więc zastosowanie odpowiedniego nośnika, który dostarczy lek genetyczny do komórki docelowej pokonując wcześniej wymienione bariery. Najskuteczniejszymi nośnikami używanymi do transferu genów i innych krótkich sekwencji nukleotydowych są wektory wirusowe, w przypadku których wykorzystuje się ich naturalną zdolność do zakażania komórek. Jednak wadą tego typu wektorów są liczne ograniczenia ich zastosowania, takie jak: silna odpowiedź immunologiczna, cytotoksyczność, krótkotrwała ekspresja, możliwość wprowadzenia transgenu tylko do komórek dzielących się, wysokie prawdopodobieństwo mutacji insercyjnych, a także trudna konstrukcja i kontrola jakości tego nośnika. Liposomowe nośniki

leków genetycznych są bardzo dobrą alternatywą. Liposomy wykorzystywane jako nośniki leków mają wiele zalet. Ze względu na skład są biodegradowalne, biokompatybilne, mało immunogenne i proste w konstrukcji. Przedstawiony projekt łączy w sobie dwa bardzo istotne zagadnienia: leczenie nowotworów opornych na standardowo stosowane chemioterapeutyki przy użyciu terapii genowej z jednoczesnym zminimalizowaniem efektów ubocznych terapii, dzięki zastosowaniu ukierunkowanego, liposomowego nośnika leku genetycznego. Celem zwiększenia skuteczności proponowanego preparatu liposomowego, do powierzchni liposomów kowalencyjnie przyłączono przeciwciała. Tiolowane przeciwciała kotwiczone w dwuwarstwie lipidowej za pośrednictwem distearoilofosfatydyloetanolaminowej pochodnej modyfikowanego resztą maleimidową glikolu polietylenowego DSPE-PEG-Mal. W pracy wykorzystano przeciwciało skierowane przeciw receptorowi CD20 (Rituximab), rozpoznające swoiście ludzkie limfocyty B. Uzyskany preparat liposomowy tL-D okazał się stabilny w obecności surowicy oraz podczas długoterminowego przechowywania w postaci zawiesiny i liofilizatu. Immunoliposomy tL-D wykazywały właściwości ochronne względem zamkniętego kwasu nukleinowego w obecności białek osocza i surowicy. Ponadto nośnik charakteryzował się niską nieswoistą aktywnością cytotoksyczną względem komórek CD20-. Do badań skuteczności *in vitro* wykorzystano linie komórkowe posiadające marker powierzchniowy CD20 nadekspresjonujące antyapoptotyczny gen *BCL2*. Za pomocą nośnika tL-D asODN uzyskano obniżenie ekspresji *BCL2* w komórkach chłoniaka Burkitta Daudi i Raji oraz komórkach jednojądrzastych izolowanych z krwi pacjentów z CLL w warunkach *in vitro*. Obniżenie ekspresji genu *BCL2* za pomocą proponowanego nośnika antysensowych oligonukleotydów anty-*BCL2* uwrażliwiała komórki Daudi na działanie mitoksantronu w warunkach *in vitro*. Bardzo obiecujące wyniki eksperymentów *in vitro* umożliwiły rozpoczęcie dalszych testów w warunkach *in vivo*, które rozpoczęto od wyznaczenia okresu półtrwania liposomów tL-D w krwiobiegu. Nośnik charakteryzował się przedłużonym czasem trwania w krwiobiegu. W analizie biodystrybucji obserwowano akumulację ukierunkowanego nośnika tL-D w guzach (CD20+). W ostatnim etapie badań *in vivo* sprawdzono efektywność leczenia nowotworu krwi za pomocą ukierunkowanego, liposomowego nośnika leku genetycznego w monoterapii oraz w połączeniu z terapią cytostatykami na modelu mysim. W tym celu myszom NOD/SCID wszczepiono podskórną ludzkie komórki chłoniaka Burkitta Daudi (CD20+). Po utworzeniu guza, myszom zaaplikowano leki w postaci immunoliposomów oraz immunoliposomów w połączeniu z niską dawką mitoksantronu. Kontrolą w eksperymencie były myszy traktowane ukierunkowanymi liposomami tL-D scODN, przeciwciałem przeciw CD20, mitoksantronem (0,3 mg/kg), oraz PBS. Na podstawie

uzyskanych danych z pomiarów wielkości guza wyznaczono dynamikę wzrostu guzów w czasie trwania eksperymentu. Zaobserwowano całkowitą remisję guzów nowotworowych w grupie traktowanej ukierunkowanymi liposomami zawierającymi asODN anty-*BCL2* w monoterapii oraz w połączeniu z małą dawką mitoksantronu. Przeprowadzone eksperymenty wskazują na wysoką skuteczność ukierunkowanej liposomowej postaci leku genetycznego w terapii nowotworu CD20+.

Preparat liposomowy jest zatem gotowy do dalszych badań przedklinicznych obejmujących dodatkowe testy *in vivo* na innych modelach zwierzęcych oraz etap uruchomienia produkcji przemysłowej w standardzie GMP.