

Uniwersytet Wrocławski
Wydział Biotechnologii

mgr inż. Martyna Maria Mianowska

**Opracowanie liposomowych formułacji wybranych
substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii
nowotworu jelita grubego**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Lipidów i Liposomów

pod kierunkiem
dr hab. Jerzego Gubernatora

Wrocław 2021

STRESZCZENIE

Nowotwory złośliwe jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) są trzecim najczęściej diagnozowanym typem nowotworów wśród kobiet i mężczyzn. Jednocześnie zajmują jedno z pierwszych miejsc wśród nowotworów pod względem liczby zgonów na świecie. W 2018 roku odnotowano 1,8 miliona nowych przypadków oraz 881 tysięcy zgonów. Na podstawie oceny demograficznej, przewiduje się wzrost liczby zachorowań, która w 2030 roku osiągnie ponad 2,2 miliony nowych przypadków oraz 1,1 miliona zgonów [1-3]. Jest to najczęściej spotykany typ nowotworów w Europie, stanowiąc najwyższy odsetek zachorowalności na świecie [4]. Niezależnie od stosowanych nowoczesnych technik chirurgicznych, nowych leków chemioterapeutycznych oraz zaawansowanej radioterapii śmiertelność wśród pacjentów z nowotworami jelita grubego nadal jest wysoka, dlatego też poszukiwane są alternatywne metody leczenia. W ciągu ostatnich kilku dekad, immunoterapia stała się jedną z obiecujących strategii osiągającą podobną skuteczność, co wyżej wymienione terapie. Pomimo szerokiego zastosowania immunoterapii w leczeniu pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego, wciąż dużym wyzwaniem pozostaje opracowanie skutecznych immunoterapii w leczeniu nowotworów litych, m.in. ze względu na występowanie mikrośrodowiska guza (ang. *tumor microenvironment*, TME) oraz braku odpowiedzi immunologicznej [5]. Jednym z mechanizmów związanych z powyższą sytuacją jest immunoedycja komórek nowotworowych przez komórki systemu odpornościowego przyczyniająca się do selekcji klonów odznaczających się niską immunogennością oraz opornością na mechanizmy odporności wrodzonej układu odpornościowego.

Efektywność fagocytozy zależy od pro-fagocytarnych cząsteczek sygnałowych „zjedz mnie” oraz anty-fagocytarnych cząsteczek „nie jedz mnie” występujących na powierzchni komórek prawidłowych oraz nowotworowych. Przykładem jest zwiększona ilość białka CD47 (ang. *cluster of differentiation 47*) na powierzchni komórek nowotworowych. Powyższe białko oddziałując z transbłonowym białkiem regulatorowym SIRP α (ang. *signal regulatory protein alpha*) na powierzchni makrofagów odpowiada za zahamowanie procesu fagocytozy komórek nowotworowych. Jedną z metod opracowania nowych form immunoterapii jest poszukiwanie procesów wywołujących immunogenną fagocytozę, do których zaliczana jest fagocytoza zależna od przeciwciała anti-CD47 (ang. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) połączona z zastosowaniem agonistów receptorów *Toll*-podobnych (ang. *toll-like receptors*, TLRs) oraz immunogenna śmierć komórki (ang. *immunogenic cell death*, ICD). Lekiem stymulującym makrofagi

STRESZCZENIE

do procesu fagocytozy jest imikwimod – agonista receptora TLR7. Związkiem potencjalnie wpływającym na fagocytozę komórek nowotworowych na skutek zajęcia ICD jak i stymulacji makrofagów jest berberyna. Wykorzystanie powyższych substancji związane jest jednak z wieloma skutkami ubocznymi oraz ich niską biodostępnością. Zastosowanie nanoonośników pozwala na efektywne dostarczenie związków stymulujących komórki układu odpornościowego przy jednoczesnym nagromadzeniu w tkance nowotworowej przyczyniając się do zmniejszenia ich cytotoksyczności względem niezmiennych nowotworowo komórek gospodarza. Liposomy - sztucznie otrzymany pęcherzyki lipidowe, stanowią w tym przypadku obiecujący nośnik dla terapii celowanych o kontrolowanym uwalnianiu substancji leczniczych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie liposomowych formułacji imikwimodu i berberyny oraz sprawdzenie ich aktywności biologicznej odpowiadającej za otrzymanie skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego. W pierwszej części pracy opisano podstawowe parametry pozwalające na aktywne zamykanie substancji za pomocą wybranych gradientów, takie jak wpływ stosunku wagowego użytej substancji do lipidów na wydajność zamykania, wpływ zewnętrznego pH na wydajność zamykania oraz wyznaczono kinetykę procesu zamykania substancji wewnątrz liposomów. Badania te pozwoliły na opracowanie optymalnych warunków enkapsulacji berberyny jak i imikwimodu wewnątrz liposomów. W kolejnych doświadczeniach zbadano stabilność długoterminową otrzymanych liposomowych formułacji obu substancji. Następnie zbadano stabilność opracowanych formułacji w obecności ludzkiego osocza *in vitro*. W przypadku berberyny określono także jej stan fizyczny wewnątrz liposomów wykorzystując do tego mikroskopię krioelektronową.

Druga część rozprawy obejmowała analizę przeprowadzonych testów komórkowych mających na celu sprawdzenie aktywności biologicznej opracowanych formułacji liposomowych berberyny oraz imikwimodu. W przypadku przeprowadzonych eksperymentów można stwierdzić, że liposomowe formułacje berberyny charakteryzowały się wysoką cytotoksycznością wobec linii komórkowych nowotworu jelita grubego, przy jednoczesnym braku aktywności biologicznej względem prawidłowej linii jelita grubego. Opracowana formułacja liposomowa zawierająca berberynę zamkniętą za pomocą gradientu witaminy C odpowiadała m.in. za generowanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), spadek poziomu zredukowanej formy glutationu (ang. *glutathione*, GSH), wyciek jonów Ca^{2+} , obniżenie poziomu mitochondrialnego potencjału

STRESZCZENIE

błonowego (ang. *mitochondrial membrane potential*, MMP) w konsekwencji prowadząc do spadku poziomu adenozyno-5'-trifosforanu (ang. *adenosine triphosphate*, ATP) przy jednoczesnym braku aktywności kaspaz oraz zwiększała ilość białka kalretikuliny (ang. *calreticulin*, CRT) na powierzchni komórek nowotworowych. Opisany mechanizm działania liposomowej postaci berberyny najprawdopodobniej związany był z wywołaniem ICD przyczyniając się do zwiększonej ilości fagocytowanych komórek nowotworowych. Ponadto wykazano, że traktowanie makrofagów powyższą formacją liposomową w znaczący sposób zwiększa fagocytozę komórek nowotworowych w porównaniu do stosowanego imikwimodu oraz przeciwciała anti-CD47. Na podstawie przeprowadzonych badań cytotoksyczności wobec makrofagów oraz testu fagocytozy można stwierdzić, że opracowana liposomowa postać imikwimodu wykazuje takie same właściwości jak wolny lek.

Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji o roli berberyny w wywołaniu odpowiedzi immunologicznej wobec nowotworu jelita grubego. Wykazano, że ilość sfagocytowanych przez makrofagi komórek nowotworowych traktowanych liposomową postacią berberyny była większa w porównaniu do nietraktowanej kontroli. Co więcej, traktowane liposomową postacią berberyny makrofagi charakteryzowały się zwiększoną aktywnością fagocytarną komórek nowotworowych.

Powyższe wnioski mogą przyczynić się do opracowania nowych form immunoterapii nowotworu jelita grubego (zwłaszcza stadium, któremu towarzyszą przerzuty), co w niniejszej pracy zostało zaprezentowane na przykładzie opisanych kombinacji związków wpływających na proces fagocytozy komórek nowotworowych.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] Araghi M., Soerjomataram I., Jenkins M., et al. *Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035*. *Int. J. Cancer*: 144, 2992–3000 (2019).
- [2] Goodarzi E., Beiranvand R., Naemi H., et al. *Worldwide incidence and mortality of colorectal cancer and human development index (HDI): an ecological study*. *WCRJ* 2019; 6:e1433 DOI:10.32113/wcrj_201911_1433.
- [3] Granados-Romero JJ., Valderrama-Trevino AI., Contreras-Flores EH., et al. *Colorectal cancer: a review*. *Int J Res Med Sci*. 2017 Nov;5(11):4667-4676.
- [4] Colorectal cancer *A guide for journalists on colorectal cancer and its treatment* <https://www.roche.com/dam/jcr:8e08ab40-4ae0-4c61-99dd-a139cce45edc/en/med-colorectal-cancer.pdf> ostatni dostę: 19.02.2021r.
- [5] Jiang Q., Zhang C., Wang H., et al. (2019) *Mitochondria-Targeting Immunogenic Cell Death Inducer Improves the Adoptive T-Cell Therapy Against Solid Tumor*. *Front. Oncol.* 9:1196. doi: 10.3389/fonc.2019.01196.