

Warszawa, 7.10.2021

mgr farm. Żaneta Słyk

Zakład Farmacji Stosowanej WUM

Tytuł rozprawy doktorskiej:

### **Hydrożelowe formulacje rAAV w terapii genowej nowotworów mózgu**

Preparaty zawierające w składzie żelatynę są wykorzystywane w klinikach chirurgicznych, między innymi podczas zabiegów neurochirurgicznych. Długoletnie zastosowanie w praktyce potwierdza bezpieczeństwo i biokompatybilność preparatów hemostatycznych jak Medisponge®. Wśród preparatów hemostatycznych, swój udział zaznaczają także preparaty złożone, zawierające oprócz żelatyny środek farmakologiczny. Stosowanie w warunkach klinicznych matryc żelatynowych zawierających substancję aktywną biologicznie, nakreśla możliwość zastosowania żelatyny jako nośnika dla innych cząstek. Biopolimery wykorzystywane są jako nośniki dla substancji chemicznych oraz genów. Terapia genowa jest rozpatrywana jako metoda adjuwantowa w odniesieniu do klasycznych terapii wykorzystywanych w leczeniu nowotworów mózgu. Zarejestrowanie preparatu genowego Zolgensma (rAAV9) dokumentuje skuteczność wnoszenia terapeutycznych transgenów przez wektory rAAV oraz podkreśla ich zastosowanie w terapii genowej ośrodkowego układu nerwowego. Rekombinowane AAV są szeroko stosowane w próbach terapii genowej OUN. Charakteryzuje je dobry profil bezpieczeństwa, stabilna i długotrwała ekspresja oraz pewien stopień tropizmu neuronalnego, związany z serotypem wektora.

Efektywność terapii wektorami rAAV jest zależna głównie od kapsydu (serotypu), który definiuje tropizm, jednak może na nią wpływać droga aplikacji preparatu. Charakter bariery krew-mózg (BBB) jest restrykcyjny, stanowi czynnik limitujący dostarczanie leków do OUN. Lokalna aplikacja formulacji genowej, na przykład śródoperacyjna po usunięciu guza nowotworowego, pozwala pominąć BBB i ukierunkować transfer genów. Jednocześnie umożliwia wydłużenie czasu przebywania preparatu genowego w miejscu aplikacji oraz zmniejszenie stopnia dyfuzji preparatów płynnych.

W niniejszej pracy opracowano żelatynowe opatrunki genowe rAAV oraz oceniono ich wpływ na potencjał transdukcyjny wektorów. Do oceny wydajności wprowadzania transgenu przez serotypy wektorów rAAV oraz oceny efektywności opatrunków genowych rAAV/matryca żelatynowa wykorzystano mózgi myszy C57BL/6 w modelu *ex vivo* oraz nowotworowe linie komórkowe w modelu *in vitro*. W badaniach *in vitro* oceniono aktywność

transdukcyjną wektorów rAAV eksponowanych na matryce żelatynowe. Analizowano ilość sekwencji *itr* (rejon flankujący genom wirusa), oraz ekspresję genu *Gfp* (transgen, gen reporterowy), wykorzystując reakcję qPCR. Metodologie *ex vivo* i *in vitro* wyłoniły wektory rAAV najefektywniej infekujące komórki mózgu – rAAVDJ i rAAV2. Metodologia *in vitro*, wykorzystująca linie komórkowe Hs683, B16-F10 oraz NIH:OVCAR-3 ujawniła selektywny charakter matrycy żelatynowej F4, której zastosowanie wiąże się z wydajnym wprowadzeniem wektorów rAAV do komórek glejaka ludzkiego Hs683. Uzyskane wyniki podkreślają wartość opracowanej formułacji rAAV/F4 w wydajnej i selektywnej transdukcji komórek glejaka ludzkiego Hs683 w porównaniu z formułacją rAAV/F7 (Medisponge®).

Praca podkreśla zasadność poszukiwania metod lokalnej terapii nowotworów mózgu. Jest źródłem wyników, oceniających bioaktywny polimer, jakim jest żelatyna pod względem zastosowania jako nośnik dla wektorów rAAV do miejscowej terapii genowej. W pracy uwidoczniło się funkcjonalną aktywność transdukcyjną opatrunków genowych rAAV.