Aktywność neurotransfekcyjna preparatów genowych: wstęp do formulacji opatrunkowych

Żaneta Słyk¹, Paulina Kruk², Sławomir Barszcz³, Krzysztof Gawrychowski¹, Maciej Małecki¹

¹ Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

² Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, magistrantka farmacji, Warszawa, Polska

³ Oddział Neurochirurgii z Pododdziałem Traumatologii Narządu Ruchu, Dziecięcy Szpital Kliniczny, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Żaneta Słyk, Zakład Farmacji Stosowanej,
Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet
Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa;
e-mail: zaneta.slyk@wum.edu.pl

Źródła finansowania

Pracę wykonano w ramach realizacji projektu
FW29/N/20 WUM.

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.12.22

Zaakceptowano: 2021.01.12

Opublikowano on-line: 2021.01.18

DOI

10.32383/farmpol/132449

ORCID

Żaneta Słyk (ORCID iD: 0000-0002-1178-7908)

Paulina Kruk (ORCID iD: 0000-0002-2483-892X)

Sławomir Barszcz (ORCID iD: 0000-0002-6004-369X)

Krzysztof Gawrychowski

(ORCID iD: 0000-0002-3666-3506)

Maciej Małecki (ORCID iD: 0000-0002-7078-4918)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Neurotransfection activity of gene preparations: introduction to dressing formulations

Background

Preparations for local anticancer therapy based on a biodegradable, dressing matrices are included in the treatment regimens of malignant gliomas of the brain. Radical resection of a neoplastic lesion is associated with the best clinical effect of treatment, however, the nature and location of the lesions often limit the scope of resection. The effectiveness of adjuvant methods such as systemic chemotherapy is limited primarily by the blood-brain barrier that is difficult to penetrate. New treatment techniques to target neoplastic cells remaining after surgical resection are searching. An interesting solution may be gene formulations for topical application, based on polymers used in dressing materials.

Aim of the study

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of introducing gene preparations into mouse brain cells. Development of an ex vivo transduction / transfection model and comparison of the efficiency of viral vectors (rAAV) and non-viral vector (FuGENE®) were assumed.

Materials and methods

The tissue of C57BL/6 laboratory mice strain were used. Brain cell mortality under the ex vivo transduction / transfection conditions was assessed. The efficiency of transfection method using the non-liposomal FuGENE® HD preparation and rAAV vector transduction method were analyzed using the standard methodology of a gene therapy laboratory. The evaluation of the itr sequences present in the rAAV / pDNA was performed by qPCR method.

Results

As a result of the research, a model of transduction / transfection of mouse brain cells using reporter viral vectors (rAAV) and the non-viral pAAV:FuGENE complex was developed. The optimal ex vivo transduction conditions were determined (temperature 37°C, time 60'). The possibility of transduction / transfection of brain cells with viral (rAAV) and non-viral (pAAV:FuGENE) gene preparations has

been demonstrated. Based on the qPCR analysis, the efficiency of transduction / transfection for the rAAV9, rAAV9/DJ and pAAV:FuGENE vectors was estimated at $9.68E+06$, $1.77E+06$ and $3.73E+06$ gc/50 ng, respectively. The rAAV9 gene preparation was selected for further formulation studies.

Conclusions

Viral and non-viral vectors are useful tools for introducing transgenes into mouse brain cells in ex vivo conditions. Based on the recombinant rAAV9 gene vector, it is possible to conduct further research in the area of the development of gene dressings for neurooncological applications.

Keywords: gene dressing formulations, rAAV preparations, brain tumors.

© Farm Pol, 2020, 76 (12): 667–675

Wprowadzenie

Choroby centralnego układu nerwowego (CUN), szczególnie mózgu, charakteryzują się zróżnicowaną etiologią, mnogością możliwych lokalizacji oraz ryzykiem nieodwracalnych zmian wywołanych patologicznym procesem w tkance mózgu. Złożoność leczenia oraz ograniczona dystrybucja środków farmakologicznych do parenchymy mózgu klasyfikują część z chorób CUN do grupy prognostycznie śmiertelnych oraz znacznie obniżających jakość życia pacjentów [1]. Największych trudności w leczeniu przysparzają choroby neurodegeneracyjne i nowotworowe. Nowotwory mózgu (ICD10; C71) w dobie współczesnego leczenia stanowią wyzwanie zarówno dla klinicystów, jak i naukowców [2]. Lokalizacja zmian nowotworowych, ucisk proliferującej masy guzowej na istotne czynnościowo ośrodki oraz swoistość anatomiczna i fizjologiczna CUN (czaszka i bariera krew-mózg (BBB)) wpływają na efektywność obecnie stosowanych terapii, chirurgicznych i farmakologicznych.

Ze względu na wysoką heterogeniczność guzów, schemat leczenia pierwotnych nowotworów mózgu nie jest zharmonizowany. Zabiegi chirurgiczne odgrywają fundamentalną rolę w onkologii CUN. Są przeprowadzane zarówno w celach terapeutycznych, jak i diagnostycznych. Efekt kliniczny wydaje się najkorzystniejszy przy przeprowadzeniu radykalnej resekcji nowotworu [3]. Konwencjonalnymi metodami adjuwantowymi są radioterapia i chemioterapia ogólnoustrojowa. Pomimo wykorzystania multidyscyplinarnych technik terapii, stosowane schematy leczenia cechuje ograniczona odpowiedź pacjentów na leczenie. Niska skuteczność terapii wynika z lokalizacji guzów, często naciekowego charakteru, a także rozmiaru wielokrotnie limitującego

zakres przeprowadzanej resekcji. W przypadkach zmian zlokalizowanych bezpośrednio w mózgu, resekcja zazwyczaj nie może zostać przeprowadzona z zachowaniem zasady czystości onkologicznej [4]. Z kolei potencjał chemioterapii, obszerne włączanie w schematy leczenia pacjentów, nie może być standardowo wykorzystany w leczeniu guzów mózgu. Grupa chemioterapeutyków stosowanych w terapii nowotworów litych OUN jest ograniczona. Niska efektywność chemioterapii ogólnoustrojowej wynika przede wszystkim z obecności trudnej do penetracji bariery krew-mózg, zawierającej transportery eksportujące lek z parenchymy, pierwotnie niskiej chemiowrażliwości (wyjątek wśród glejaków stanowią skąpodrzewiaki) i nabytej chemiooporności guzów. BBB rozważana jako struktura limitująca transport leków przeciwnowotworowych staje się mniej istotna przy zastosowaniu miejscowej drogi podania. Miejscowa aplikacja leku umożliwia dobór wielkości zastosowanej dawki, a zatem wpływa na koszty terapii, jak i działania niepożądane wywołane przez leki podawane dożylnie. Gliadel Wafer, czyli karmustyna inkorporowana w biodegradowalną matrycę polimerową, stanowi alternatywę chemioterapii ogólnoustrojowej u pacjentów z niedawno zdiagnozowanym glejakiem o wysokim stopniu złośliwości [5]. Przeprowadzona w 2015 r. metaanaliza sugeruje, że terapia miejscowa karmustyną może korzystnie wpływać na długość przeżycia pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym [6].

Wśród preparatów wykorzystywanych w klinikach onkologicznych są także biodegradowalne opatrunki hemostatyczne, umieszczane często w łożu poguzowej i powszechnie wykorzystywane w trakcie resekcji neurochirurgicznych [7]. Mechanizm działania hemostatycznego jest zróżnicowany i uzależniony od wykorzystanego polimeru. Można wyróżnić opatrunki żelatynowe, celulozowe czy kolagenowe. Ciekawym rozwiązaniem wprowadzenia czynnika hamującego krwawienie jest połączenie opatrunku z trombiną [8]. Efekt terapeutyczny uzyskany poprzez inkorporację substancji farmakologicznych do biodegradowalnych matryc/opatrunków aplikowanych miejscowo jest znakiem rozwoju innych strategii wzmagających efektywność zabiegów chirurgicznych. Miejscowe zastosowanie biodegradowalnych materiałów o aktywności przeciwnowotworowej, eliminujących pozostałe po resekcji komórki nowotworowe, może przynieść wymierne korzyści.

W ostatnich latach zarejestrowano preparaty oparte na sekwencjach kodujących DNA czy wykorzystujące wektory wirusowe [9]. Preparaty genowe są także rozważane jako „surowce”

mogące zostać wykorzystane do recepturowych formuacji genowych, postaci płynnych, półstałych i stałych [10]. Jako wektory genów proponowane są rekombinowane wirusy towarzyszące adenowirusom (rAAV). rAAV charakteryzują się wieloma korzystnymi właściwościami, które naznaczają je jako potencjalne i atrakcyjne nośniki transgenów w terapii genowej u ludzi. Wektory rAAV są niechorobotwórcze,iskoimmunogenne, a także nie integrują z genomem gospodarza. Są otrzymywane w wysokich mianach oraz wykazują stabilność podczas przechowywania. Istnieje kilkanaście serotypów wektorów rAAV wykazujących specyficzny tropizm tkankowy, ponadto, nieskomplikowana budowa kapsydu umożliwia wprowadzanie modyfikacji nakierowujących wektory na wybrane komórki [11]. Istotnym jest, że wirusy rAAV są zdolne do infekowania zarówno komórek w fazie podziału, jak i tych niedzieliących się, a zatem stanowią potencjalny wektor w leczeniu chorób mózgu. Celem niniejszej pracy była ocena efektywności wprowadzenia preparatów genowych do komórek mózgu mysiego w warunkach *ex vivo*. Ocena wydajności wprowadzania transgenów umożliwiła wyselekcjonowanie efektywnego serotypu, będącego podstawą dalszych badań ukierunkowanych na opracowanie opatrunkowych formuacji genowych do zastosowań klinicznych w neuroonkologii (np. w przebiegu leczenia glejaków mózgu). Analizowano wydajność wprowadzania genów metodą transfekcji, wykorzystując nieliposomalny preparat FuGENE® HD oraz metodą transdukcji z użyciem wektorów rAAV, stosując standardową metodologię laboratorium terapii genowej.

Materiały i metody

Zwierzęta laboratoryjne, pobranie materiału biologicznego

Do badań wykorzystano narzędzia pozyskiwane z myszy laboratoryjnych szczepu C57BL/6, samców w wieku 6–8 tygodni. Myszy C57BL/6 wybrano ze względu na przyszłe badania z wykorzystaniem komórek linii czerniaka mysiego B16-F10 (ATCC® CRL-6475™), które można implementować zwierzętom. W dalszych pracach zaplanowano przeprowadzenie badań z wykorzystaniem

Rycina 1. Pobieranie tkanki mózgu myszy C57BL/6 do badań. Jałową płytkę Petriego umieszczano w statywie zawierającym skalę milimetrową. Mózg sytuowano w pozycji, gdzie potyliczna część znajdowała się bliżej pobierającego. Pierwszego cięcia dokonywano w 1/2 wysokości mózgu prostopadle do powierzchni płytki, drugiego pod kątem ~18°, na wysokości 2 mm od cięcia nr 1. Uzyskiwany fragment ważył ~10 mg. Skrawki uzyskiwano symetrycznie z obu półkul mózgu.

Figure 1. Collection of C57BL/6 mouse brain tissue. Sterile Petri dish was placed in a stand containing a millimeter scale. The brain was set in a position where the occipital part was closer to the researcher. The first incision was made of 1/2 the height of the brain perpendicular to the surface of the plate, the second at an angle of ~18°, 2 mm from the cut no 1. The obtained fragment weighed ~10 mg. Sections were obtained symmetrically from both cerebral hemispheres.

linii komórkowej ludzkiego glejaka HS 683 (ATCC® HTB-138™) i myszy Nude/SCID. Zwierzęta pochodziły z Centralnego Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta do czasu pobrania tkanek utrzymywano w standardowych warunkach. Wilgotność powietrza w pomieszczeniach znajdowała się na poziomie 55% ± 10%, temperatura wynosiła 20–24°C, a maksymalna wartość hałasu 35 DB. Cykl świetlny regulowano w trybie 12h/12h. Wymiana powietrza następowała co najmniej 15 razy na godzinę. Myszy uśmiercano stosując środek znieczulenia ogólnego – 4% mieszaninę izofluranu z powietrzem. Po 3–4 min oceniano czynności życiowe, na podstawie zaniku oddechu i akcji serca potwierdzano możliwość pobrania mózgow. Po otwarciu czaszki, usuwano mózg i umieszczano w płytce Petriego wypełnionej PBS (Gibco™) (0–4°C) i umieszczonej na lodzie. Z każdego mózgu pobierano odpowiedni fragment około 10 mg. Cięcia przeprowadzano po ciemieniowej stronie od punktu bregma (**rycina 1**). Z każdej półkuli mózgu wykorzystano 1 fragment.

Zgodnie z ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. poz. 266), procedurą nie jest uśmiercanie zwierzęcia w celu

wykorzystania tkanek lub narządów do badań. Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Spraw Doświadczeń na Zwierzętach nie jest wymagana.

Ocena żywotności mózgów myszy C57BL/6 inkubowanych w DMEM w warunkach *ex vivo*.

Ocenę żywotności komórek mózgu myszy C57BL/6 przeprowadzono w oparciu o zestaw CytoSelect™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cell-Biolabs), który umożliwia ocenę aktywności dehydrogenazy mleczanowej uwolnionej do pożywki hodowlanej. Protokół producenta zmodyfikowano poprzez zwiększenie ilości pożywki hodowlanej, pozostałe zalecenia zostały zachowane. Mysie mózgi umieszczono w medium hodowlanym DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™) wzbogaconym o 2,0% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco™) i 1,0% AAS (Antibiotic-Antymycotic, Gibco™) w temperaturze 37°C. Probówki umieszczono w termobloku zaprogramowanym na temperaturę 37°C, 300 obr./min. Próbkę do oceny spektrofotometrycznej pobierano w czasie 0, 30, 60, 90 i 120 min. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru (Epoch, Biotek). Próby badane stanowiły mózgi mysie inkubowane w temperaturze 37°C, 300 obr./min. Próby pozytywne uzyskano poprzez wprowadzenie do pożywki hodowlanej odczynnika lizującego Triton X.

Przygotowanie preparatów genowych: wektorów rAAV i kompleksów FuGENE:pAAV-IRES-hrGFP do transdukcji/transfekcji komórek mózgowych w warunkach *ex vivo*

Przeprowadzono badania z wykorzystaniem reporterowych wektorów wirusowych i niewirusowych. Do badań wykorzystano preparaty rekombinowanych wektorów wirusowych AAV (*Adeno-associated virus*): rAAV9-CAG-GFP oraz rAAV9/DJ-CAG-GFP (nr kat. 7076 i 7119, Vector Biolabs). Kompleksy plazmidowego DNA z nośnikiem FuGENE® przygotowano opierając się na zaleceniach producenta oraz własnych doświadczeniach. Kompleksy FuGENE:pDNA (5:1) uzyskano poprzez połączenie 2,55 µl FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) z 0,51 µg pAAV-IRES-GFP (Agilent).

Transdukcja i transfekcja w warunkach *ex vivo*

Do niskoretencyjnych probówek typu eppendorf wprowadzono 50,0 µl DMEM i 0,26 µl rAAV (miano 10¹³ gc/ml) lub 45,0 µl mieszaniny zawierającej FuGene® oraz fragmenty mózgów o masie 10 mg.

Inkubację prowadzono przez 60 min w temperaturze 37°C, 300 obr./min, następnie próbki wirowano (1 min, 1500 obr./min). Mieszaninę transdukcijną/transfekcyjną odrzucono. Przeprowadzono płukanie tkanki. Na procedurę składało się: wprowadzenie 200,0 µl DMEM (T = 37°C), wytrząsanie (3 min, 300 obr./min), wirowanie (1 min, 1500 obr./min) oraz odrzucenie supernatantu. Procedurę powtarzano 3-krotnie. Tkanke przechowywano w temperaturze -80°C do czasu izolacji materiału DNA.

Kontrolę negatywną stanowiły fragmenty mózgów mysich inkubowane w warunkach transdukcyjnych/transfekcyjnych bez preparatów genowych.

Izolacja DNA z tkanek

Izolację DNA z transdukowanych wektorami rAAV i transfekowanych kompleksem FuGENE:pAAV-IRES-hrGFP fragmentów mózgu myszy C57BL/6 przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Procedura postępowania była zgodna z protokołem producenta. Uzyskane izolaty DNA przechowywano w temperaturze -20°C, do momentu kolejnych badań.

Ocena wydajności transdukcji/transfekcji metodą qPCR

Reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) przeprowadzono w celu oceny ilościowej wprowadzonych do komórek wektorów rAAV lub plazmidowego DNA. Ocenie poddano obecne w rAAV/pDNA sekwencje *itr*. Przeprowadzono analizę metodą bezwzględną z wykorzystaniem krzywej wzorcowej, generowanej poprzez seryjne rozcieńczenia plazmidu pAAV-IRES-hrGFP. W analizie wykorzystano sondę TaqMan 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-3' i startery: forward 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' oraz reverse 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3'[12]. Objętość reakcji qPCR wynosiła 10 µl, zawierała 50 ng DNA i przebiegała w następujących warunkach: 50°C przez 2 min, 95°C przez 10 min, 40 cykli 95°C przez 15 sek i 60°C przez 1 min. Do badania wykorzystano aparat StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Każdą próbę wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki

Względna śmiertelność komórek mózgu w zastosowanych warunkach transdukcyjnych/transfekcyjnych

Oceniono żywotność komórek mózgu mysiego C57BL/6 w zastosowanych warunkach inkubacji, temperaturze 37°C oraz czasie od 0-120 min. Przeprowadzono test aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Wyniki zostały przedstawione

w odniesieniu do kontroli pozytywnej (Triton+), której wartość przyjęto jako 100,0%. Na podstawie badań określono maksymalny (akceptowalny) czas transdukcji *ex vivo*, tj. 60 min. Średnia śmiertelność komórek inkubowanych przez 30 min znajduje się na poziomie ~8,0%, natomiast po upływie

60 min śmiertelność wzrasta średnio dwukrotnie (**rycina 2**, część A). Uzupełnienie wyników uzyskano z pomiaru stężenia DNA w izolatach mysich mózgów inkubowanych w czasie od 30–90 min. Stężenie DNA wyraźnie spada w 90 min inkubacji (**rycina 2**, część B). Uzyskane stężenia DNA

B

Czas transdukcji (min)	Stężenie DNA (ng/μl)	$\bar{x}$	Współczynnik A260/280	$\bar{x}$	Współczynnik A260/230	$\bar{x}$
30	26,38	30,99	1,98	1,95	1,77	1,80
	35,60		1,93		1,83	
60	26,82	27,14	1,99	2,00	1,88	1,92
	27,47		2,01		1,96	
90	19,50	17,99	1,98	2,00	1,91	1,91
	16,48		2,02		1,91	
K30	23,27	23,12	2,00	1,98	1,78	1,86
	22,98		1,97		1,93	
K60	22,45	24,10	1,99	2,00	1,84	1,84
	25,67		2,01		1,84	
K90	17,24	16,34	1,98	1,97	1,95	1,98
	15,45		1,96		2,01

Rycina 2. Wpływ zastosowanych warunków transdukcji *ex vivo* na śmiertelność komórek mózgu myszy C57BL/6.

Część A przedstawia względną procentową śmiertelność w odniesieniu do próby pozytywnej (Triton+). Dane przedstawiono jako standardowy wykres pudełkowy, gdzie linia środkowa przedstawia medianę, natomiast górna i dolna granica są odpowiednio wartościami maksymalną i minimalną. Część B, stężenie DNA w izolatach uzyskanych z tkanek inkubowanych w czasie 0–90 min. K – próby nie poddane transdukcji. Część C, wizualizacja DNA w żelu agarozowym po elektroforetycznym rozdzieleniu produktów reakcji PCR z zastosowaniem starterów specyficznych do β -aktyny.

Figure 2. The effect of the *ex vivo* transduction conditions on mortality of C57BL/6 mice brain cells. Part A shows the relative percentage mortality compared to the positive sample (Triton+). The data is presented as a standard boxplot, with the middle line representing the median and the upper and lower bounds being the maximum and minimum values, respectively. Part B shows DNA concentration in isolates obtained from tissues incubated at 0–90 min. K – non-transduced samples. Part C presents visualization of DNA in an agarose gel after electrophoretic separation of PCR products. PCR was performed with β -actin specific primers.

dla prób inkubowanych 60 min i 90 min wynosiły odpowiednio 27,14 ng/ μ l i 17,99 ng/ μ l. W części C **ryciny 2** przedstawiono wynik wizualizacji żelu agarozowego w świetle UV. Oceniono jakość wyizolowanego DNA, uzyskanego z prób transdukowanych w czasie od 0 do 90 min poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem starterów specyficznych do genu metabolizmu podstawowego – β -aktyny (starter forward 5'-GACGTTGACATCCGTAAAGA-3', starter reverse 5'-GCAGTAATCTCCTTCTGCAT-3'). Wizualizacja żelu (część C) pozwala zaobserwować słabszą fluorescencję prążka odpowiadającego inkubacji prowadzonej przez 90 min.

Ocena aktywności transdukcyjnej/transfekcyjnej preparatów genowych metodą qPCR

Wyniki reakcji qPCR przedstawiono w postaci liczby kopii *itr* w 50 ng wyizolowanego DNA (**rycina 3**). Uzyskane wyniki wskazują, że możliwe jest wprowadzenie wektorów wirusowych (rAAV9 i rAAV9/DJ) oraz niewirusowych (FuGENE:pAAV-IRES-hrGFP) do tkanki mózgu

w zastosowanych warunkach *ex vivo*. Najwydajniejszy w warunkach *ex vivo* jest wektor wirusowy rAAV9. Uwzględniając liczbę cząstek plazmidowego DNA oraz standaryzację dawki na równoważną wektorom wirusowym (2,6E + 09 gc/ μ l), oceniono, że wektor niewirusowy charakteryzuje się mniejszą wydajnością wprowadzania transgenu (**rycina 3**). Wydajność z zastosowaniem wektora FuGENE[®] wyniosła 17%, natomiast zastosowanie wektora rAAV9 wiąże się z 44% wydajnością (**tabela 1**). Potencjał infekcyjny wektora rAAV9/DJ scharakteryzowano na podstawie otrzymanych wyników jako średnio ponad 5-krotnie niższy w porównaniu z wektorem rAAV9. Z analizy wynika, że większą powtarzalność uzyskano dla preparatów transdukowanych wektorami wirusowymi (**tabela 2**).

Dyskusja i wnioski

Niespełna 50 lat temu (w marcu 1972 r.) Theodore Friedmann i Richard Roblin na łamach czasopisma „Science” podkreślali potencjał terapii genowej przewidując jej zastosowanie w leczeniu ludzkich chorób o podłożu genetycznym [13]. Ostatnie kilkanaście lat podstawowych badań z zakresu biologii komórki i wirusologii oraz udoskonalenie modeli chorób i identyfikacja ich molekularnych patomechanizmów wpłynęło na rozwój terapii genowej, skutkując wzrostem bezpieczeństwa, poprawą wydajności wprowadzenia transgenów, a także licznymi sukcesami klinicznymi. O wysokiej pozycji terapii genowej, w wiodących dziedzinach współczesnej nauki, świadczy także corocznie wzrastająca liczba badań klinicznych na świecie oraz czasopism i konferencji dedykowanych wyłącznie terapii genowej. Potencjał genoterapii dostrzegalny jest także w podejmowanych przedsięwzięciach z zakresu neuroonkologii. Wielu autorów podkreśla znaczenie terapeutyczne genów samobójczych, supresorowych, immunomodulacyjnych czy wirusów onkolitycznych [14]. Część autorów nadaje terapii genowej w przyszłości pozycję techniki adjuwantowej w odniesieniu do klasycznej chirurgii, chemioterapii i radioterapii w glejakiach mózgu [15–17]. Wśród badań eksperymentalnych nad glejakiem mózgu prowadzone są prace nad miejscową aplikacją preparatów genowych [18]. John A Barrett i inni przeprowadzili doguzowe podanie wektora adenowirusowego, kodującego interleukinę 12, na mysim modelu glejaka

Rycina 3. Wydajność wprowadzania transgenu w warunkach *ex vivo*.

Rycina przedstawia wyniki reakcji qPCR. Dane przedstawiono jako liczba kopii *itr* identyfikowane w 50 ng DNA. Kontrolę negatywną stanowiły fragmenty mózgow mysich inkubowane w warunkach transdukcyjnych/transfekcyjnych bez preparatów genowych. Transdukcję/transfekcję przeprowadzono wykorzystując 2,6E+09 gc/10 mg tkanki, stosując kompleks pAAV:FuGENE oraz wektory wirusowe rAAV9 i rAAV9/DJ. Rycina uwidacznia istotne różnice wydajności wprowadzania transgenu przy pomocy wektorów wirusowych rAAV i niewirusowego kompleksu pAAV:FuGENE.

Figure 3. The efficiency of transgene introduction in *ex vivo* conditions. The figure shows the results of the qPCR reaction. Data are presented as the *itr* copy identified in 50 ng DNA. Fragments of mouse brains incubated under transduction/transfection conditions without gene preparations were a negative control. Transduction/transfection with 2.6E + 09 gc/10 mg tissue using the pAAV:FuGENE complex and the rAAV9 and rAAV9/DJ viral vectors was performed. The figure shows significant differences in the efficiency of transgene introduction with rAAV viral vectors and the pAAV:FuGENE non-viral complex.

wielopostaciowego. Ekspresja pozostawała pod kontrolą podawanego doustnie induktora przekraczającego barierę krew – mózg, RheoSwitch Therapeutic System® (RTS®). Sukces badań w postaci remisji guza u 95% zwierząt przyczynił się do rozpoczęcia badań klinicznych z udziałem pacjentów z nawrotem choroby [19]. W związku z niską medianą przeżycia pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem, trwają intensywne poszukiwania nowych metod leczenia, także z zastosowaniem terapii genowej wykorzystującej zarówno wektory wirusowe, jak i niewirusowe [20]. Z kolei ogólnoustrojowa aplikacja preparatów genowych, z którą wiąże się m.in. wychwyt wektorów przez inne niż mózg narządy podczas procesu dystrybucji oraz konieczność zastosowania wyższej dawki w konsekwencji mogącej skutkować pojawieniem się działań niepożądanych, wydaje się mniej atrakcyjna w odniesieniu do terapii lokalnej. Ponadto, bariera krew–mózg skutecznie uniemożliwia osiągnięcie przez preparat parenchymy mózgu [21]. Cel niniejszej pracy, sprowadzający się do oceny aktywności wprowadzania transgenów z wykorzystaniem nośników wirusowych i niewirusowych do komórek mózgu, wymagał opracowania modelu odzwierciedlającego miejscową aplikację preparatu w warunkach *in vivo*. Zastosowano model *ex vivo*. Na podstawie przeprowadzonych badań oceniających śmiertelność komórek mózgu w zastosowanych warunkach inkubacyjnych (37°C, 60 min, 300 obr./min), potwierdzono zasadność użycia zaproponowanego modelu. Jak pokazuje **rycina 2** model *ex vivo* może zostać zaimplantowany do badań transdukcji tkanki mózgu. Zastosowanie modelu *ex vivo* pozwala ocenić aktywność transdukcijną/transfekcyjną preparatów genowych na prawidłowych komórkach mózgu. Użyty model umożliwia przygotowanie formuacji farmaceutycznej z odpowiednim wektorem do kolejnego etapu badań w warunkach *in vivo*. Potwierdzeniem zachowania funkcji fizjologicznych przez inkubowane w zastosowanych warunkach komórki mózgu są również dostępne w literaturze naukowe protokoły badania aktywności neuronów w skrawkach pobranej tkanki. Jak donoszą autorzy przedział czasowy dzielący pobranie tkanek i utworzenie skrawków krótszy niż 10 minut oraz godzinny interwał przechowywania skrawków w temperaturze pokojowej wiąże się z zachowaniem funkcji biologicznych [22].

W niniejszej pracy opracowany model transdukcji *ex vivo* został wykorzystany do oceny aktywności wprowadzania genów przez niewirusowy nośnik FuGENE® oraz wektory rAAV9 oraz rAAV9/DJ (**tabela 3**). Analizy dokonano na podstawie wyników otrzymanych po reakcji PCR w czasie rzeczywistym, wystandaryzowanych na liczbę kopii

Tabela 1. Przygotowanie formuacji genowych. Tabela przedstawia dane wykorzystane do oceny wydajności zastosowanych w pracy wektorów wirusowych rAAV oraz niewirusowego kompleksu pAAV:FuGENE. Liczba kopii sekwencji *itr*/10 mg tkanki została oszacowana w oparciu o stężenie DNA w izolatach potransdukcyjnych/potransfekcyjnych. Odzysk nośnika przedstawia zidentyfikowane kopie *itr*/10 mg tkanki jako procentową wartość zastosowanej dawki. Tabela obrazuje wyraźne różnice wydajności wprowadzania transgenów w warunkach *ex vivo* przez wektory wirusowe rAAV oraz niewirusowy kompleks pAAV:FuGENE.

Table 1. Preparation of gene formulations. The table presents the data used to evaluate the efficiency of the rAAV viral vectors and the pAAV:FuGENE non-viral complex. The *itr* copy sequence/10 mg tissue was estimated based on the DNA concentration in post-transduction/post-transfection isolates. Vector's recovery represents the identified *itr* copies/10mg tissue as a percentage of the applied dose. The table shows the significant differences in the *ex vivo* transduction / transfection efficiency of the rAAV viral vectors and the pAAV:FuGENE non-viral complex.

Nośnik	pAAV:FuGENE	rAAV9	rAAV9/DJ
gc/50 ng DNA	3,74E+06	9,68E+06	1,77E+06
gc/10 mg tkanki	4,45E+08	1,14E+09	2,00E+08
zastosowana dawka (gc)	2,6E+09	2,60E+09	2,60E+09
odzysk nośnika	17%	44%	8%

sekwencji *itr*/50 ng DNA wyizolowanego z tkanek. Najwyższą efektywnością w zastosowanych warunkach charakteryzował się wektor wirusowy rAAV9. Zastosowanie rAAV9 wiąże się z ponad dwukrotnie wyższą efektywnością wprowadzania transgenów (9,68E+06 gc/50 ng DNA) w odniesieniu do kompleksu FuGENE®:pAAV-IRES-hrGFP

Tabela 2. Wydajność transdukcji/transfekcji mózgu w warunkach *ex vivo*. Tabela podaje wydajność transdukcji/transfekcji uzyskaną poprzez zastosowanie wektorów rAAV oraz niewirusowego nośnika FuGENE®. Wyniki podano jako liczbę kopii *itr*, obecnych w rAAV/pAAV, oznaczoną w 50 ng DNA wyizolowanego z fragmentów mózgu myszy C57BL/6 transdukowanych/transfekowanych w warunkach *ex vivo*.

Table 2. The efficiency of brain transduction/transfection in *ex vivo* conditions. The table shows the transduction/transfection efficiency obtained by using rAAV vectors and the non-viral FuGENE® carrier. The results are given as the number of *itr* copies present in rAAV/pAAV, determined in 50 ng of DNA isolated from *ex vivo* transduced/transfected C57BL/6 mouse brain fragments.

Preparat genowy	Powtórzenie	Liczba kopii (gc/50 ng)	Średnia (gc/50 ng)	SD
rAAV9	rAAV9.1	1,15E+07	9,68E+06	1,66E+06
	rAAV9.2	8,30E+06		
	rAAV9.3	9,20E+06		
rAAV9/DJ	rAAV9/DJ.1	1,44E+06	1,77E+06	4,09E+05
	rAAV9/DJ.2	1,65E+06		
	rAAV9/DJ.3	2,23E+06		
pAAV:FuGENE	FuGENE.1	3,44E+06	3,74E+06	1,67E+06
	FuGENE.2	2,23E+06		
	FuGENE.3	5,54E+06		

Tabela 3. Charakterystyka wykorzystanych neurotransfekcyjnych preparatów genowych. W pracy wykorzystano wirusowe (rAAV9, rAAV9/DJ) i niewirusowe (pAAV:FuGENE) preparaty genowe. W tabeli uwzględniono podstawowe cechy charakteryzujące wykorzystane wektory rAAV i kompleks pAAV:FuGENE.

Table 3. Characteristics of neurotransfection vectors. Viral (rAAV9, rAAV9/DJ) and non-viral (pAAV: FuGENE) gene preparations were used. The table includes the basic features of rAAV and the pAAV: FuGENE complex.

Nośnik/Wektor	Typ nośnika	Rozmiar (pz/średnica)	Stężenie/Miano (stok oryginalny)	Gen reporterowy	Promotor	Identyfikowana sekwencja
AAV9	Wirusowy	4700/20 nm	10 ¹³ gc/ml	eGfp	cag	itr
AAV9/DJ	Wirusowy	4700/20 nm	10 ¹³ gc/ml	eGfp	cag	itr
pAAV:FuGENE	Niewirusowy	6000	1,0 µg/ul	hrGfp	cag	itr

(3,74E+06 gc/50 ng DNA) (tabela 2). W literaturze obejmującej tematykę leczenia nowotworów mózgu, wektory niewirusowe są charakteryzowane jako posiadające kilka cennych właściwości. Między innymi wydają się być mniej toksyczne i nie wykazują wcześniej istniejącej immunogenności, jak wektory wirusowe. Często charakteryzuje je większa pojemność transgeny, a także wskazywane są jako nośniki łatwiejsze do modyfikacji podczas przygotowywania preparatów specyficznie rozpoznających tkanki [23]. Jednakże rozpatrując biobezpieczeństwo wektorów, należy zauważyć, że uzyskanie wyższej wydajności transferu genów przy pomocy wektorów niewirusowych, jak FuGENE®, wiąże się z koniecznością zastosowania wielokrotnie wyższych dawek DNA niż w przypadku wektorów wirusowych rAAV w celu uzyskania porównywalnego efektu biologicznego. Ekstrapolując uzyskane wyniki, zastosowanie ilości cząstek plazmidowego DNA w ilości równej dawce rAAV (2,6+E09 gc) skutkowałoby wydajnością wprowadzenia transgeny na poziomie ~17% (tabela 1). Według B. Wiesenhofer, W.A. Kaufmann i C. Humpel komórki glejaka (C6) są transfekowane z najwyższą wydajnością przy użyciu preparatu FuGENE® (w odniesieniu do nośników lipidowych Lipofectamine, Dosper, Escort, Superfect) [24]. Podobną analizę przeprowadzili S. Djurovic, N. Iversen, S. Jeansson i inni, wykorzystując pierwotną hodowlę kardiomiocytów. Autorzy wskazali FuGENE® jako jeden z wydajniejszych niewirusowych nośników, obok Lipofectamine. Jednakże najkorzystniejszym wektorem pod względem oceny poziomu ekspresji wprowadzanego genu został wektor wirusowy rAAV2, po zastosowaniu którego stężenie β-galaktozydazy przy podaniu dawki 1,0E+09 gc osiągnęło 88,1% [25]. Zastosowane w niniejszej pracy serotypy (rAAV9 oraz rAAV9/DJ) wektorów rAAV osiągnęły zróżnicowany poziom transdukcji (rycina 3). Większą ilość kopii genu *itr* zidentyfikowano w izolatach tkanek transdukowanych serotypem rAAV9 (5-krotnie w odniesieniu do rAAV9/DJ). Zależność ta pozostaje prawdopodobnie w funkcji budowy kapsydów i nie jest

związana z dedykowanym wektorowi rAAV9 neurotropizmem. rAAV9 jest określany serotypem neurotropowym, ze względu na powinowactwo do układu nerwowego po podaniu dożylnym i zdolności przekraczania BBB. Zjawisko to wiązano z pokonywaniem bariery krew-mózg na drodze prostej dyfuzji, jednakże próby koadministracji wektorów rAAV wraz ze związkiem osmotycznie czynnym, powodującym zwiększenie przepuszczalności BBB, nie wykazały wpływu na penetrację bariery, sugerując, że nośniki przekraczają BBB na drodze aktywnego transportu [26]. Wektor rAAV9/DJ został skonstruowany poprzez modyfikację dwóch domen wiążących heparynę, zlokalizowanych w serotypie mozaikowym rAAVDJ na sekwencję aminokwasów występującą w serotypie rAAV9. Niższa wydajność transdukcji komórek z wykorzystaniem wektora rAAV9/DJ wskazuje, że najprawdopodobniej wprowadzone sekwencje aminokwasów wektora rAAV9 nie są kluczowe podczas transdukcji mózgu w warunkach *ex vivo*. Receptorem wskazywanym jako istotny w procesie wydajnej transdukcji komórek wektorem rAAV9 jest receptor dla laminin (LamR) [27]. Większość wszystkich zidentyfikowanych laminin i ich receptorów występuje w CNS. Receptory dla laminin zostały zlokalizowane w astrocytach, pericytach, neuronach, komórkach endotelialnych, a także komórkach progenitorowych [28]. Ekspresja receptorów lamininowych w CNS może stanowić wyjaśnienie wydajności procesu transdukcji przeprowadzanego z zastosowaniem wektora rAAV9 i rAAV9/DJ.

Wyłonienie wektora charakteryzującego się wydajną transdukcją komórek mózgu w warunkach *ex vivo*, stanowi podstawę do opracowania recepturowej formułacji do stosowania śródoperacyjnego w ramach terapii CNS. W chwili obecnej w Zakładzie Farmacji Stosowanej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego trwają badania związane z przygotowaniem oryginalnych formułacji genowych (opatrunków genowych) dla pacjentów onkologicznych. Wstępne wyniki wskazują na możliwość uzyskania formułacji półstałych o śródoperacyjnej użyteczności w zakresie neuroonkologii.

Piśmiennictwo

- Farmanfarma K, Mohammadian M, Shahabinia Z, Hassanipour S i Salehiniya H. Brain cancer in the world: an epidemiological review. *World Cancer Research Journal* 2019; 6: 1–5.
- Aldape K, Brindle KM, Chesler L, Chopra R, Gajjar A, Gilbert MR, Gottardo N, Gutmann DH, Hargrave D, Holland EC, Jones DTW, Joyce JA, Kearns P, Kieran MW, Mellinghoff IK, Merchant M, Pfister SM, Pollard SM, Ramaswamy V, Rich JN, Robinson GW, Rowitch DH, Sampson JH, Taylor MD, Workman P i Gilbertson RJ. Challenges to curing primary brain tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019; 16(8): 509–520.
- Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, Cha S, Tihan T, Vandenberg S, McDermott MW i Berger MS. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(8): 1338–1345.
- Lara-Velazquez M, Al-Kharboosh R, Jeanneret S, Vazquez-Ramos C, Mahato D, Tavaniaepour D, Rahmathulla G i Quinones-Hinojosa A. Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults. *Brain Sciences* 2017; 7(12): 150–166.
- Ashby LS, Smith KA i Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World journal of surgical oncology* 2016; 14(1): 225.
- Xing W-K, Shao C, Qi ZY, Yang C i Wang Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug design, development and therapy* 2015; 9: 3341–3348.
- Paulo D, Semonche A, Choudhry O, Al-Mufti F, Prestigiacomo CJ, Roychowdhury S, Nanda A i Gupta G. History of Hemostasis in Neurosurgery. *World Neurosurgery* 2019; 124: 237–250.
- Landi A, Gregori F, Marotta N i Delfini R. Efficacy, security, and manageability of gelified hemostatic matrix in bleeding control during thoracic and lumbar spine surgery: FloSeal versus Surgiflo. *Journal of Neurological Surgery. Part A, Central European neurosurgery* 2016; 77(2): 139–143.
- Keeler AM i Flotte TR. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annual review of virology* 2019; 6(1): 601–621.
- Bierkowska A, Słyk Ż, Banaczowska-Duda E, Malecki M. Formu-lacje leków genowych, recepty genowe. *Farmacja Polska* 2018; 74(10): 611–615.
- Kotterman MA i Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2014; 15(7): 445–451.
- Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A i Baiker A. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Human Gene Therapy Methods*. 2012; 23(1): 18–28.
- Friedmann T i Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science* 1972; 175(4025): 949–955.
- Giotta Lucifero A, Luzzi S, Brambilla I, Guarracino C, Mosconi M, Foiadelli T i Savasta S. Gene therapies for high-grade gliomas: from the bench to the bedside. *Acta Biomedica* 2020; 91(7–S): 32–50.
- Germano IM i Binello E. Gene therapy as an adjuvant treatment for malignant gliomas: from bench to bedside. *Journal of Neuro-Oncology* 2009; 93(1): 79–87.
- Hossain JA, Marchini A, Fehse B, Bjerkvig R i Miletic H. Suicide gene therapy for the treatment of high-grade glioma: past lessons, present trends, and future prospects. *Neuro-Oncology Advances* 2020; 2(1): vdaa013.
- Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N i Ylä-Herttua S. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Molecular Therapy* 2004; 10(5): 967–972.
- Barrett JA, Cai H, Miao J, Khare PD, Gonzalez P, Dalsing-Hernandez J, Sharma G, Chan T, Cooper LJ i Lebel F. Regulated intratumoral expression of IL-12 using a RheoSwitch Therapeutic System® (RTS®) gene switch as gene therapy for the treatment of glioma. *Cancer Gene Therapy* 2018; 25(5): 106–116.
- Lebel FM, Barrett JA, Chiocca EA, Yu J, Lukas RV, Nagpal S, Kum-theekar P, Krishnan S i Cooper LJ. Effect of controlled intratumoral viral delivery of Ad-RTS-hIL-12 + oral vedolimex in subjects with recurrent or progressive glioma. *Journal of Clinical Oncology*. 2016; 34(15_suppl): 2052–2052.
- Murphy AM i Rabkin SD. Current status of gene therapy for brain tumors. *Translational Research* 2013; 161(4): 339–354.
- Bhowmik A, Khan R i Ghosh MK. Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International* 2015; 2015: 320941–320941.
- Verhoog MB, Goriounova NA, Obermayer J, Stroeder J, Hjorth JJJ, Testa-Silva G, Baayen JC, de Kock CPJ, Meredith RM i Mansvelder HD. Mechanisms Underlying the Rules for Associative Plasticity at Adult Human Neocortical Synapses. *Journal of Neuroscience* 2013; 33(43): 17197–17208.
- Wang S i Huang R. Non-viral nucleic acid delivery to the central nervous system and brain tumors. *The Journal of Gene Medicine* 2019; 21(7): e3091.
- Wiesenhofer B, Kaufmann WA i Humpel C. Improved lipid-mediated gene transfer in C6 glioma cells and primary glial cells using FuGene™. *Journal of Neuroscience Methods* 1999; 92(1): 145–152.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F i Christensen G. Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Molecular Biotechnology*. 2004; 28(1): 21–32.
- Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR i Samulski RJ. Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates. *Molecular Therapy* 2011; 19(6): 1058–1069.
- Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H i Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology*. 2006; 80(19): 9831–9836.
- Nirwane A i Yao Y. Laminins and their receptors in the CNS. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2019; 94(1): 283–306.