

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Plazmid DNS-alapú nanomedicina formuláció fejlesztése

LŐRINCZ ORSOLYA

Témavezető: Dr. Lisziewicz Julianna

KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged

2013

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben hatalmas érdeklődés övezi a nanomedicina technológiákat, különösképpen a génterápia területén. A nanogyógyszerekben a hatóanyag általában valamilyen nukleinsav, leggyakrabban plazmid DNS (pDNS). Azonban a nukleinsavak sejtekbe való célzott és hatékony bejuttatásának módjára még ma sem egyértelmű, hogy milyen módszer a legalkalmasabb. Egyik megoldás lehet szintetikus polimerek használata, melyeket kémiai szintézissel állítanak elő. Ilyenek a poliaminosavak (pl. polilizin), vagy a poli(etilén-glikol), illetve a dolgozat tárgyát is képező polietilénimin (PEI) és származékai. Ezek hatékonyan és célzottan képesek eljuttatni a szervezetben a kívánt sejtekhez a nukleinsavat (vagy akár fehérjéket, peptidket), mivel kisebb kémiai módosításokkal olyan molekulák köthetők rájuk, melyeket a célozni kívánt sejtek felismernek (receptor-specifikus ágensek). A PEI képes megvédeni a belé „csomagolt” nukleinsavat mind a sejtek közötti, mind a sejten belüli degradációtól. Amellett, hogy hatékony beviteli „eszköz”, az ilyen nukleinsav/polimer nanomedicina további előnyös tulajdonsága, hogy a két komponens oldatainak összekeverésével önrendeződő folyamatban alakulnak ki a nanorészecskék, így előállításuk egyszerű. Ilyen pDNS/polimer nanorészecskéket sikeresen alkalmaztak állatkísérletekben számos indikációra, köztük rákos modellekben is. Mindezen előnyök ellenére óriási problémát jelent klinikai relevancia szempontjából, hogy ezek a pDNS/polimer nanorészecskék nagyon rövid ideig képesek stabilak maradni, vizes szuszpenziójuk pár óra alatt kiülepszik, a részecskék dezintegrálódnak. Emiatt alkalmazásuk meglehetősen nehézkes, mivel mindig frissen kell készíteni közvetlenül a kezelés előtt.

Munkám során egy olyan innovatív nanomedicina termékjelölt, a DermaVir formulációjának fejlesztésén dolgoztam, amely jelenleg fázis II-es klinikai stádiumban van, HIV és AIDS elleni terápiás vakcinaként. Napjainkban a fertőző betegségek közül a HIV-fertőzés és az AIDS a világ egyik legnagyobb egészségügyi kihívása. Több mint 30 millió regisztrált HIV-fertőzött van világszerte, akik közül mindössze kb. 5 milliót kezelnek az elérhető gyógyszeres terápiával. A vírusellenes gyógyszerek forradalmasították ugyan a fertőzés kezelését, de csak az AIDS-betegség késleltetett kifejlődését okozzák, nem gyógyítanak, emiatt nagy hangsúlyt fektetnek ma is sokan a megfelelő ellenszer (preventív vagy terápiás) megtalálására.

A DermaVir nanomedicina hatóanyaga egy plazmid DNS (polianion), amely a HIV vírus 15 fehérjét kódolja. Ezt a pDNS-t lineáris polietilénimin-mannobióz (PEIm, polikation) segítségével 100-300 nm-es nanorészecskékké formuláljuk a két oldat 10%-os glükóz/dextróz oldatban való összekeverésével. A kialakuló nanorészecske mérete és felülete miatt is vírusokra, kórokozókra hasonlít, ezért patogén-szerű részecskének nevezzük.

A DermaVir nanomedicina jelenlegi klinikán használt formulációját a helyszínen frissen készíti a klinikai gyógyszerész három, különböző hőmérsékleten tárolt komponensből (köztük a pDNS -80°C-on), majd nagyon rövid stabilitása miatt 3 órán belül fel is kell használnia. A készítményt transzdermális adminisztráció során a megfelelően előkészített bőrfelületen alkalmazzák. A bőr előkészítése során aktiválódott úgynevezett epidermális Langerhans-sejtek veszik fel a nanorészecskéket, és eljuttatják őket a legközelebbi nyirokcsomókba. Miután a Langerhans-sejt felveszi a nanorészecskét, az egy endoszómába zárul, ahol a sejt fokozatosan elkezd csökkenti a pH-t a protonpumpák segítségével. Ekkor a PEIm pufferelő hatásának köszönhetően megvédi a részecske belsejében lévő pDNS-t. Ez a védelmi mechanizmus alapvető ahhoz, hogy a pDNS sértetlenül jusson el a sejtmagig, és a benne kódolt fehérjék kifejeződhessenek. Így jön létre az immunválasz: a sejt a pDNS-ről átíródott fehérjéket mutatja be a nyirokcsomóban várakozó naiv T-sejteknek, amik így a HIV-re specifikus citotoxikus T-sejtekké proliferálódnak.

A cél egy stabil, egyszerűbb formuláció kidolgozása, azonban mivel ez a termék már túl van a szükséges toxikológiai vizsgálatokon, csak olyan paraméterek változtathatók, melyek nem írják elő újabb biztonságossági klinikai vizsgálatokat, melyek évekkel késleltethetik a termék piacra kerülését. A formuláció egyszerűsítésére szükség van részben azért, hogy a kórházi nővér is elkészíthesse a készítményt, ne igényeljen klinikai gyógyszerészt, illetve azért, hogy ne legyen szükség olyan különleges tárolási körülményekre, mint a -80°C-os ultramély-hűtő. További cél a DermaVir nanomedicina szerkezet-biológiai aktivitás kapcsolat felderítése, és a fenti mechanizmus igazolása.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A nanorészecskék előállítása a következő módon történt: egy térfogat pDNS oldatot kihígítunk 3 térfogat formulációs oldószerrel, egy térfogat PEIm oldatot is kihígítunk 3 rész formulációs oldószerrel, végül ezeket keverjük össze 1-1 térfogatarányban. A nanorészecskék maguktól kialakulnak, a komponensek molaránya, vagyis a nitrogén-foszfor arány (N/P) 4,2. Az elkészítés után 20 percig inkubáltuk a folyadék-formulációt a laboratórium hőmérsékleten.

A pDNS különböző topoizomereinek kvantitatív meghatározásához agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk, majd az Image J szoftver segítségével denzitometrikus alapon értékeltük a topoizomerek százalékos arányát. A nanorészecskék dekomplexálását nátrium-dodecil-szulfát 1000-szeres moláris feleslegével végeztük, hogy vizsgálhassuk a belül lévő pDNS állapotát agaróz gélelektroforézissel (topoizomereinek arányát).

Az UV-spektrofotometriás méréseknél a teljes spektrumot rögzítettük, 190-1100 nm között, 5 nm-es léptékkel, melyből leginkább a 260 nm-en mért pDNS-hez tartozó abszorbancia maximumot használtuk az értékeléshez. A nanorészecskéknél megfigyelt hiperkromofória számítása: a nanorészecske 260 nm-en mért abszorbanciájának a komponensek 260 nm-en mért abszorbancia-összegéhez viszonyított növekedése százalékos formában.

Részecskeméret meghatározásnál a használt készülék (Brookhaven) a dinamikus fényszórás (DLS) elvét alkalmazva a részecskék hidrodinamikai átmérőjét határozza meg a Stokes-Einstein egyenlet alapján. Ugyanezeket a mintákat használtuk a zeta potenciál méréseknél, modellnek pedig a Smoluchowski egyenletet választottuk.

Az atomerő mikroszkópos (AFM) felvételek készítésénél 7 µl nanorészecske szuszpenziót argon áramban megszárítottuk a friss mica lemezre. A felvételek letapogató üzemmódban készültek, értékelésükhöz a Nanoscope Imaging és az Image J szoftvereket használtuk.

A PEIm protonáltságát a pH függvényében pH-potenciometrikus titrálással vizsgáltuk. A protonálódási együtthatót PSEQUAD program segítségével becsültük.

A formulációk biológiai aktivitását *in vitro* sejtkultúrán teszteltük. A DermaVirt lemezre kiültetett sejtekre pipettázva, 21 óra inkubáció után leszívott felülúszóból az

expresszált fehérjéket kvantifikáltuk HIV-1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszer segítségével, így számszerűsítve az adott formuláció biológiai aktivitását.

A PEIm- és a pDNS oldatban lévő szerves ionok mennyiségi meghatározására az induktív csatolású plazma – tömeg spektrometria (ICP-MS) méréseket az EPA 6020 európai szabványnak megfelelően végeztettük, 3 párhuzamost használva. A PEIm szénttartalmának meghatározására a total organikus karbon (TOC) méréseket az MSZ EN 1484:1998 nemzetközi szabványnak megfelelően végeztettük, 3 párhuzamost használva. A PEIm klórtartalmának meghatározására az adszorbeálható összes szerves halogén (AOX) méréseket az MSZ EN ISO 9562:2005 nemzetközi szabványnak megfelelően végeztettük, 3 párhuzamost használva.

EREDMÉNYEK

1. A DermaVir nanomedicina komponenseinek optimalizálása és minőségi előírataik kidolgozása

Megfigyeltük, hogy a pDNS és a PEIm komponensek különböző sarzsai különböző biológiai aktivitást mutattak, annak ellenére, hogy akkori specificációjuknak megfeleltek. Részletes elemáanalízis során kiderült, hogy mindkét komponens esetében az ionos jelleg az, ami eltérő a sarzsok között. A pDNS-nél az ionerősség (leginkább a NaCl tartalom), a PEIm esetében pedig a kationos jelleg volt különböző (a polimerhez kötött hidroklorid mennyisége). A hatékony génextpresszió megőrzéséhez és a stabilitás eléréséhez a komponenseket külön-külön és a rendszert egészében is vizsgálat alá vetettük és megtaláltuk e kritikus paraméterek optimumát, kibővítettük az anyagok minőségi előíratait (specificációit). A stabilitás érdekében a formulációs oldószerként használt glükóz oldatot lecseréltük, mert az nem kívánt mellékreakcióba lép a polimerrel. Több biológiai puffert/oldószert vizsgálva mind a plazmid, mind a nanorészecske eltarthatósága szempontjából arra jutottunk, hogy a leggyakrabban alkalmazott Tris, foszfát puffer, EDTA és fiziológiás sóoldatok nem alkalmasak a célra, mivel egyik sem volt képes megőrizni a részecske biológiai aktivitását hosszabb, vagy akár rövidebb távon. Találtunk azonban egy olyan rendszert, amelynél ez a probléma nem lép fel, és puffertartománya is a megfelelő;

7,3-8,3 tartományban található. Ez a puffer a trietanolamin-hidroklorid, amely a gyógyszerkönyvben is megtalálható. A tesztek során arra is fény derült, hogy a hatásosság szempontjából szükség van cukorszerű anyagra a nanomedicina formulációban. Hogy a glükózzal előforduló mellékreakciót kikerüljük redukáló csoportot nem tartalmazó cukoralkoholokat vizsgáltunk, melyek közül a mannitol- és a szacharóz-tartalmú elérte a korábbi biológiai aktivitást. Végül a pH optimalizálásával egy mannitol-tartalmú trietanolamin-hidroklorid puffert (TEAM) választottunk, amely 7,5-es pH-jával (a korábbi pH~3 helyett) és redukáló csoportot nem tartalmazó cukortartalmával indifferens a nanorészecskére és annak komponenseire, mindemellett megőrzi a jelenlegi klinikai formuláció biológiai aktivitását.

2. Stabil DermaVir formulációs lehetőségei

A komponensek optimalizálása és a megfelelő oldószer kiválasztása után a hosszabb távú stabilitás vizsgálatok során kidolgoztunk egy stabil folyadék-formulációt, mely az irodalomban eddig egyedülálló stabilitást mutatott: 37°C-on 3 hétig, 4°C-on 8 hétig tárolva a frissen készített kontrollal megegyező biológiai aktivitást mérhettünk. A folyadék-formuláció mellett hosszabb távra tervezve egy olyan kétfiolás, -20°C-on tárolt formulációt is kidolgoztunk, melyben a TEAM pufferrel hígított pDNS illetve a PEIm, külön fiolába kerül, és a kiolvasztás után egyszerűen összekeverhető a két oldat. Ez a formuláció 1 éves stabilitás adattal rendelkezik, a jelenlegivel ellentétben nem igényel különleges tárolást, nem kell klinikai gyógyszerésznek elkészítenie bonyolult előírás szerint, elegendő a nővér hozzá.

3. Hiperkromofória, mint a szerkezet-aktivitás összefüggés mutatója, és befolyásoló tényezői

A fejlesztési munka során feltérképeztük a DermaVir nanomedicina szerkezet-aktivitás összefüggéseit is. Ennek során a jelenlegi klinikai, glükózban formulált formulációt vizsgáltuk az újjal szemben, mely a TEAM pufferben formulált ionos környezetben optimalizált pDNS és PEIm oldatokból áll össze. Atomerő mikroszkópos felvételekről kiderült, hogy a jelenlegi klinikai formuláció részecskéi nem elég tömörek, a pDNS szálai kitüremkednek a PEIm burok alól, ezzel szemben az új formuláció polimer burka teljes védelmet nyújt a pDNS-nek, kompakt, tömör „kérget” alkotva. Ez magyarázatot nyújt a két formuláció közötti biológiai aktivitás különbségre, hiszen az új formuláció átlagosan kb. 30-

50%-kal magasabb potenciát mutat. Több fizikokémiai tulajdonságot is vizsgálva azt találtuk, hogy kizárólag a részecskék UV spektrofotometriásan mérhető hiperkromofóriája az a paraméter, amely összefüggésbe hozható a biológiai aktivitásbeli eltérésekkel. Ez a hiperkromofória, amely akkor jelenik meg, amikor a nanorészecske kialakul, eltérő mértéket mutat a jelenlegi klinikai és az új formulációknál, annak ellenére, hogy a két formulációban mind a részecskék átlag mérete, mind azok méreteloszlása nagyon hasonló. A potensebb, új formulációnál konzekvensen magasabb hiperkromofória mérhető, mint a kisebb aktivitású jelenlegi klinikai formulációnál. A hiperkromofória jelenségét több oldalról vizsgálva azt találtuk, hogy a formuláció ionerőssége és a pH befolyásolják, mint az ionos környezet alapvető meghatározói. Az eredményekből arra jutottunk, hogy a hiperkromofória nem más, mint a részecske tömörségének mértéke, vagyis a pDNS és a PEIm között kialakuló kötéseknek tulajdonítható, és mértékét azok száma határozza meg; minél több kötés alakul ki, a hiperkromofória annál magasabb. Ezt az elméletet igazoltuk AFM felvételekkel, valamint gél retardációs kísérlettel, nukleáz enzimmel szembeni ellenállás vizsgálatával és termodinamikai stabilitás vizsgálatokkal is. Eredményeink szerint a megfelelő biológiai aktivitáshoz arra van szükség, hogy a nanorészecske elég stabil legyen ahhoz, hogy túlélje az endoszómát a sejten belül, de utána a sejtmag közelébe jutva időben el kell engednie a plazmidot, hogy az bejuthasson a sejtmagba és a fehérjék expresszáldhassanak. Ehhez a kényes egyensúlyhoz pedig a hiperkromofória optimumára van szükség, ami az új formulációnál teljesül. Miután a DermaVir nanorészecske a 2 komponens elektrosztatikus kölcsönhatásainak köszönhetően alakul ki, mind a pDNS, mind a PEIm ionos karaktere meghatározó abban, hogy milyen mértékű kölcsönhatás alakulhat ki közöttük, illetve a részecske kialakulása után a külső burok PEIm-en milyen mértékben marad protonátlan amin csoport, amivel a sejtbe való bejutás után pufferelő szerepét betöltheti. A jelenlegi klinikai formulációban a pDNS foszfátcsoportjainak nagy része nátriumsó formájában van, így hiába erősen kationos a PEIm nitrogénjeinek protonáltsága, nem tud kompakt nanorészecske kialakulni. Ráadásul a polimer a sejtben sem képes megóvni a plazmidot a csökkenő pH-tól, miután kevés a semleges nitrogén. Ezzel szemben az új formulációban a pDNS mellett kb. másfél nagyságrenddel kevesebb nátrium található, így azon foszfátcsoportok száma is jóval kisebb, melyek só formájában vannak. A kevésbé kationos PEIm így több kötést tud kialakítani a pDNS-sel, és a semleges aminok nagyobb száma miatt az endoszóma pufferelése is hatékony, megvédve ezzel a szállított pDNS-t a korai

degradációtól. A pH vizsgálatával hasonlót figyeltünk meg; alacsony pH-n a gyenge sav pDNS disszociációja visszaszorul, a PEIm protonálódása pedig fokozottabb, így kevesebb kötés jöhet létre köztük, és kevés a pufferelni képes semleges nitrogén. Ezzel szemben magasabb pH-n a pDNS disszociációfoka nő, a PEIm protonálódása ugyan visszaszorul, de miután az négyszeres feleslegben van, még így is nagyszámú kötés alakul ki a komponensek között, ezzel kompakt nanorészecskét létrehozva, melyen a PEIm semleges nitrogénjeinek száma is megfelelő az endoszóma protonjainak megkötéséhez. A legmeggyőzőbb bizonyíték erre, hogy mikor az új, optimalizált formuláció pH-ját a jelenlegi klinikainak megfelelő 3-as körültre állítjuk, a biológiai aktivitás is annak a szintjére csökken, függetlenül attól, hogy a pDNS és a PEIm komponensek az optimalizált ionos karakterűek.

A stabil nanomedicina formuláció kidolgozása során tehát optimalizáltuk a komponenseket, a formulációs oldószert, felállítottuk a nanorészecske sejten belüli hatásmechanizmusát, a szerkezet-aktivitás összefüggést és igazoltuk azt. Bevezettünk egy új, egyszerű analitikai módszert, amely összefüggésben van a részecske biológiai aktivitásával azáltal, hogy képes kimutatni a pDNS/PEIm nanorészecske kompaktságát, tömörségét. Kibővítettük a komponensek és a nanomedicina specifikációját az új kritikus paraméterekkel, így a DermaVir a fázis III-as klinikai vizsgálatokat már az új, fejlesztett termékkel kezdi meg. A dolgozat témájához kapcsolódó fejlesztések és eredmények fontos mérföldkövet jelentenek a DermaVir nanomedicina mind kémiai, mind klinikai fejlesztése során, amit tudományos cikkek és egy benyújtott szabadalom is alátámaszt.

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- Tőke, E.R., Lőrincz, O., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Rational development of a stable liquid formulation for nanomedicine products, *Int. J. Pharm.* 2010, 392, 261-267.
- Lőrincz, O., Tőke, E.R., Somogyi, E., Horkay, F., Chandran, P.L., Douglas, J.F., Szebeni, J., Lisziewicz, J. Structure and biological activity of pathogen-like synthetic nanomedicines. *Nanomedicine: NBM.* 2012, 8, 497–506.
- Lőrincz, O., Lisziewicz, J. Transdermal immunotherapy with synthetic pathogen-like nanomedicines and its clinical application towards the cure of HIV. *Handbook of Clinical Nanomedicine: From Bench to Bedside.* Pan Stanford Publishing, Szerk.: Raj Bawa, Gerald F. Audette, ISBN 9789814316170. Kiadónál, tördelés alatt.
- Lisziewicz, J., Lőrincz, O. HIV-specific immunotherapy with DermaVir, the first pDNA/PEIm pathogen-like nanomedicine. *Eur. J. Nanomed.* 2012, 4, 81–87.
- Edina Garaczi, E., Szabó, K., Franciszti, L., Csiszovszki, Zs., Lőrincz, O., Tőke, E.R., Molnár, L., Bitai, T., Jánossy, T., Bata-Csörgő, Zs., Kemény, L., Lisziewicz, J. DermAll nanomedicine for allergen-specific immunotherapy. *Nanomedicine: NBM.* 2013. DOI: 10.1016/j.nano.2013.05.011

SZABADALOM

Immunogenic nanomedicine composition (Immunogén gyógyászati nanokészítmény).
Feltalálók: Tőke R. Enikő, Lőrincz Orsolya, Somogyi Eszter, Pandur József, Lisziewicz Julianna. Magyar Szabadalmi Bejelentés. Iktatószám: HU 0910727. Benyújtva: 2009.05.14.

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Jakab, I.N., Lőrincz, O., Jancsó, A., Gajda, T., Gyurcsik, B. Approaching the minimal metal ion binding peptide for structural and functional metalloenzyme mimicking. *Dalton Transactions*, 2008, 6987–6995.

KONFERENCIA RÉSZVÉTEL

Előadás:

Lőrincz, O., Tőke, E.R., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Relationship between biophysical and biological properties of NanoComp. 3rd annual meeting of Vaccine Therapy Cluster. Nemzetközi konferencia, 2008, Mátraháza.

Poszterek:

- Tőke, E.R., Lőrincz, O., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Liquid nanomedicine formulation for plasmid DNA-based vaccine products. Rational design of HIV vaccines and microbicides, Network Annual Conference, 2009, Budapest.
- Lőrincz, O., Tőke, E.R., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Structure and biological activity of pDNA-based nanomedicine vaccines. Rational design of HIV vaccines and microbicides, Network Annual Conference, 2009, Budapest.
- Tőke, E.R., Lőrincz, O., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Nanotechnology to improve the biological activity of DNA vaccines. XVIIIth International Aids Conference, 2010, Bécs, Ausztria.
- Lőrincz, O., Tőke, E.R., Somogyi, E., Lisziewicz, J. Formulation development and structure-activity relationship of DermaVir nanomedicine. 9th International Symposium on Polymer Therapeutics, 2012, Valencia, Spanyolország.
- Lisziewicz, J., Csiszovszki, Zs., Lőrincz, O., Lajos Kemény, L., Garaczi, E. Dermal Nanomedicine for Allergen-Specific Immunotherapy (ASIT). *J. Allergy Clin Immunol*, vol.

131, Nr. 2. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2013, San Antonio, Texas, USA.

- Garaczi, E., Szabó, K., Csiszovszki, Zs., Lőrincz, O., Kemény, L., Lisziewicz, J. DermAll ASIT: a new nanomedicine-based allergen-specific immunotherapy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization, World Allergy and Asthma Congress, 2013, Milánó, Olaszország (Poster Discussion-re elfogadva).