

PB3.4. Vývoj nanočástic pro cílené opravy genů (Konvalinka)

Cíle výzkumu

- Návrh a charakterizace membránově zakotvené T7 RNA polymerázy a produkce stabilní tkáňové linie Tet-off systémem regulovatelných HEK293 buněk exprimujících modifikovanou T7 RNA polymerázu
- Návrh a charakterizace adaptorového proteinu, který bude mít za úkol přenášet konkrétní mRNA k buněčné membráně, ve které se následně zakotví a vystaví na povrchu buňky molekulu pro specifické adresování
- Vývoj tzv. buněčné metodologie, zahrnující výše zmíněnou modifikovanou T7 RNA polymerázu a adaptorový protein, která bude umožňovat produkci nanočástic na bázi exosomů, přenášejících mRNA a umožňujících cílení do konkrétních buněk či tkání
- Návrh CRISPR/Cas9, které degradují cccDNA viru žloutenky typu B
- Vývoj tzv. syntetické metodologie umožňující produkci výše zmíněných částic, založené na liposomu podobných nanočásticích
- Testování částic získaných oběma navrženými metodologiemi ve tkáňových kulturách

Výzkumný plán a metodologie

Na základě našich dřívějších úspěchů v oblasti vývoje modulárních syntetických protilátek založených na funkcionalizovaných polymerech, navrhujeme multidisciplinární přístup, který kombinuje nejnovější techniky molekulární biologie, eukaryotické biologie a polymerní syntetické chemie (Dr. Petr Cígler, Dr. Pavel Majer), k vývoji vysoce sofistikované technologie umožňující přenos mRNA kódující programovatelnou nukleázu k cílovým buňkám. Obtížně léčitelný cíl, na který se primárně zaměříme, představuje kompletní eradikace cccDNA viru žloutenky typu B, čímž významným způsobem doplníme celkový vědecký koncept předkládaného projektu.

Výsledky našeho bádání také umožní cílený přenos funkcionalizovaných DNA aptamerů, které budou vyvíjeny v laboratořích Dr. Michala Hocka a Dr. Edwarda Curtise, čímž významným způsobem podpoříme jejich výzkum.

I přes nemalý pokrok v oblasti terapií založených na mRNA, zejména v imunoterapii nádorových onemocnění, mRNA jakožto aktivní účinná látka v ostatních aplikacích zůstává stále v preklinickém základním výzkumu. Hlavní výzvu reprezentuje otázka, jak specificky dopravit IVT-mRNA do cílové buňky. Navíc je třeba uvážit, že kombinace IVT-mRNA a programovatelných nukleáz umožňujících sice poměrně přesnou, ale stále ještě ne zcela bez nežádoucích off-target efektů, editaci genomu, vyžaduje naprosto spolehlivé cílení. Z tohoto důvodu navrhujeme vyvinout buněčnou metodologii umožňující produkci nanočástic nesoucích mRNA. Daná mRNA bude kódovat CRISPR/Cas9 nukleázu, která umožní degradaci cccDNA viru žloutenky typu B, čímž výrazně zminimalizuje či dokonce eradikuje latentní formu tohoto viru.

Nejprve vytvoříme klony HEK293 buněk, stabilně produkující pod regulačním systémem Tet-off, T7 RNA polymerázu (Fig. 1.). Přeložená T7 RNA polymerasa bude asociovat s buněčnou membránou díky membránové značce. Buňky budou dále transferovány plasmidem kódujícím fluorescenční protein mKATEII pod T7 promotorovou sekvencí. Přepsaná mRNA se bude akumulovat u membrány, což bude umocněno také adaptorovým proteinem s extracelulární cílovací adresou. Adaptor bude zkombinován z motivu bakteriofága MS2 vázající specificky mRNA a z membránově vázajícího peptidu. Vysoká akumulace mRNA blízko buněčné membrány umožní vytvoření exosomu. Tento exosom bude obsahovat mRNA kódující mKATEII a po odštěpení z membrány bude uvolněn do extracelulárního prostoru. Následně budou tyto funkčně upravené exosomy posbírány a použity na “transfekci” cílové tkáňové kultury. Úspěšnost této “transfekce” bude evaluována pomocí průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie. Tyto základní studie nadále poslouží k vývoji částic přenášejících mRNA kódující CRISPR/Cas9 degradující cccDNA viru žloutenky typu B (spolupráce s Dr. Janem Weberem).

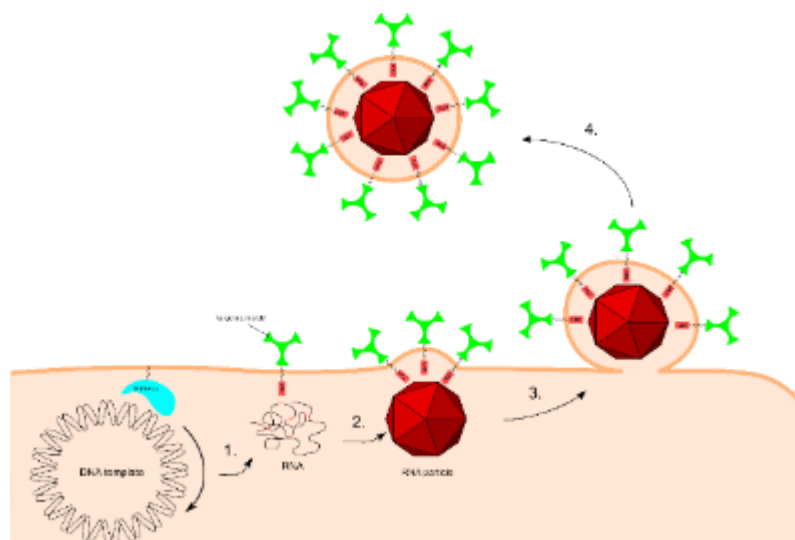


Fig.1. Schéma buněčné metodologie přípravy nanočástic obsahujících mRNA. 1. Krok představuje mRNA transkripci blízko buněčné membrány. 2. Krok ukazuje akumulaci mRNA u buněčné membrány a její zakotvení v membráně pomocí adaptorového proteinu. Následuje formace exosomu (Krok 3) a jeho uvolnění (Krok 4).

Druhý postup produkce cílených mRNA nanopartikulí bude zahrnovat námi upravené recentní “syntetické” technologie zabývající se částicemi podobnými liposomům. Syntetické liposomy, částice nejvíce podobné přírodním exosomům, jsou charakteristické minimální imunogenicitou a také poměrně snadným rozbalením se v cílové buňce, umožňují tak únik částice z degradační dráhy a uvolnění účinné látky. Vytvoříme tedy tzv. inverzní liposomální micely, které budou obsahovat IVT-mRNA, tím, že smícháme v určitém daném poměru kationický lipid DOSPA (2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(spermincarboxamido)-ethyl]-N,N-dimethyl-1-propylammonium chloride) a pomocný lipid DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycerophosphatidylethanolamine) (Fig. 2A.)². Dále z těchto inverzních liposomů vytvoříme asymetrické liposomy: inverzní liposomy budou tzv. urychleny přes vnější lipidovou mezifázi, která bude obsahovat neutrální lipidy (např. DOPE) a lipidy námi modifikované obsahující cílovací adresu (modifikované DOPE) (Fig. 2B)². Konečné asymetrické modifikované liposomy nesoucí mRNA budou rozpuštěny ve vodné fázi. Zmíněný proces může být urychlen centrifugací.

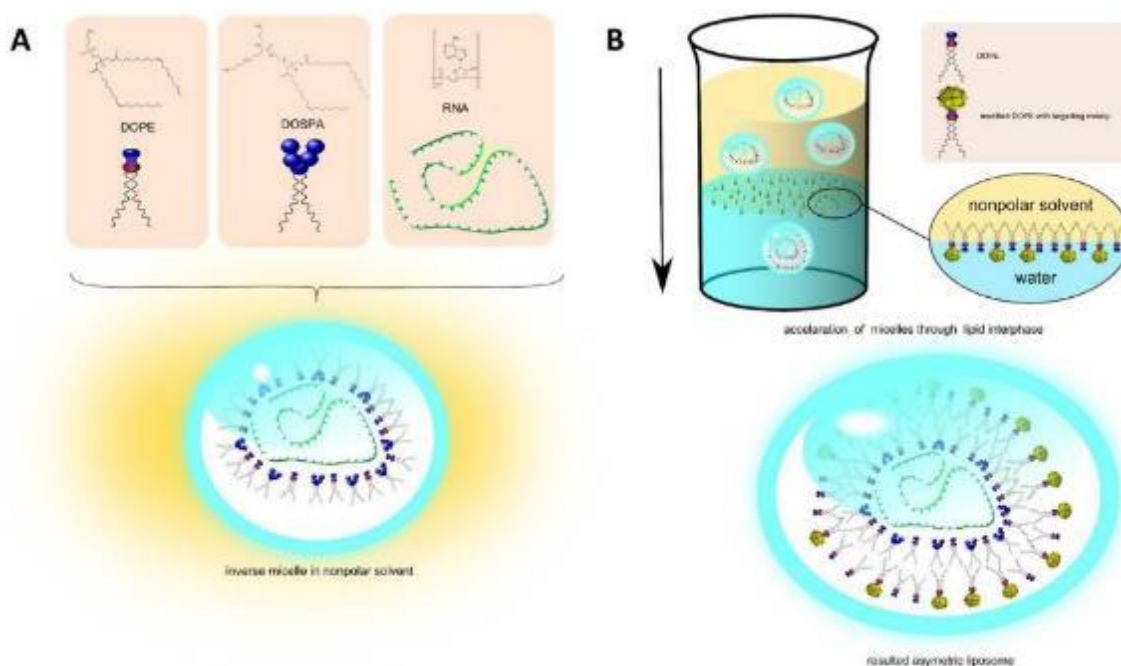


Fig.2. Schéma produkce liposomů obsahujících IVT-mRNA s cílovací adresou. A) Smíchání kationického lipidu DOSPA s IVT-mRNA a pomocným neutrálním lipidem DOPE, které vede k vytvoření inverzních micel. B) Urychlovací postup vedoucí k vytvoření ve vodě rozpustných liposomů s funkcionalizovaným DOPE lipidem umožňujícím adresování.

Zároveň se budeme zabývat druhým alternativním přístupem přípravy nanočástic vytvořených také smícháním IVT-mRNA, DOSPA a DOPE lipidů, tentokrát ale ve vodném prostředí (Fig.3.)³. Vzniklé multilamelární liposomy budou dále protlačeny a promyty za účelem vytvoření unifikované laminární částice (LUV). Tyto budou dále konjugovány funkcionalizovaným HPMA(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide) kopolymerem s amino-reaktivní skupinou a cílovací adresou. Tato vnější vrstva HPMA zvýší stabilitu a umožní cílování do určitých buněk.

Oba tzv. “syntetické” přístupy přípravy upravených liposomů umožní také specifické zabalení a doručování DNA aptamerů vyvinutých v laboratořích prof. Michala Hocka a Dr. Edwarda Curtise, čímž umožníme využití různorodé expertízy ke společnému cíli.

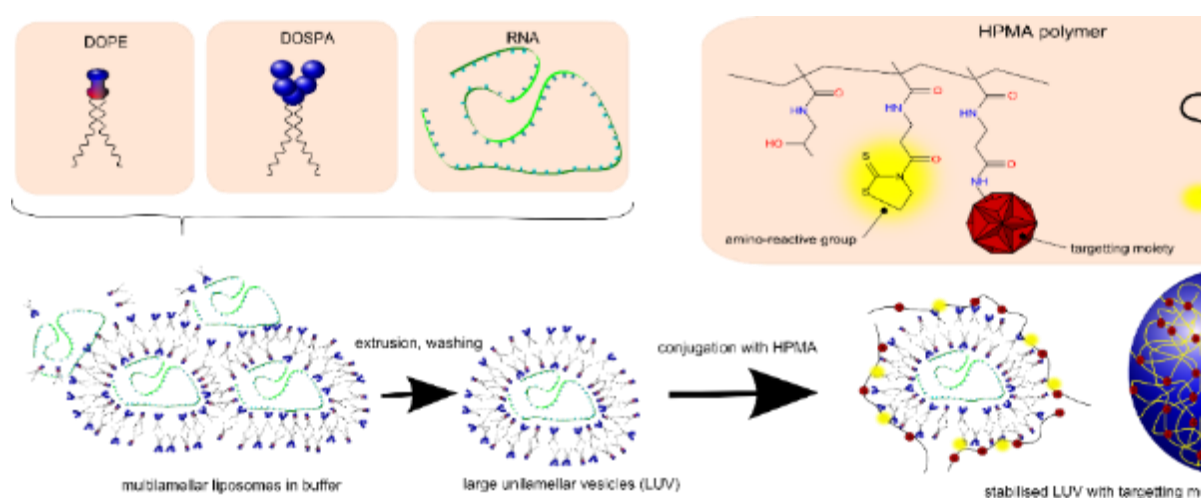


Fig.3. Schéma alternativního postupu tvorby syntetických liposomů obsahujících IVT-mRNA a skupinu umožňující cílení. Nejprve jsou vytvořeny multilamelární liposomy, které následným protlačením a promytím dají vzniknout LUV partikulám. Ty budou dále obaleny HPMA kopolymerem s amino-reaktivní skupinou. Takto se vytvoří stabilizované LUVs obsahující mRNA a cílovací skupinu.

Jako relevantní klinický cíl našeho přístupu „cíleného editování genomu“ jsme zvolili virus hepatitidy typu B (HBV). HBV infekce představuje problém globálního charakteru postihující miliony lidí na celém světě, kteří jsou vystaveni vysokému riziku vzniku chronických onemocnění jater jako je hepatitida, cirhóza či hepatocelulární karcinom. Dnešní terapie chronické hepatitidy typu B využívá analoga nukleotidů či nukleosidů, která HBV infekci sice udržují pod kontrolou, ale nejsou schopny ji zcela eliminovat. Klíčový faktor této virové persistence je vnitrobuněčný replikační intermediát HBV genomu – cirkulární DNA (cccDNA), která zůstává v jádře infikovaných buněk jako neintegrováná plasmidu podobná molekula sloužící HBV viru jako transkripční templát. I přes intenzivní výzkum HBV infekce jsou strategie degradace a eliminace cccDNA limitovány. Proto je naším hlavním cílem aplikovat liposomální nanočástice kombinované s mRNA Cas9 a gRNA k degradaci cccDNA a tím položit základy ke kompletnímu vyléčení HBV infekce.

Odkazy:

- [1] Kennedy, E. M., Kornepati, A. V. R. & Cullen, B. R. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antivir Res* **123**, 188-192, (2015).
- [2] Whittenton, J. *et al.* Evaluation of asymmetric liposomal nanoparticles for encapsulation of polynucleotides. *Langmuir* **24**, 8533-8540, (2008).
- [3] Fenske, D. B. & Cullis, P. R. Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes. *Liposomes, Pt E* **391**, 7-40, (2005)

Časový plán

2018-2021

- Návrh a charakterizace membránově vázané T7 RNA polymerasy a produkce stabilních Tet-off regulovatelných klonů HEK293 buněk exprimujících upravenou T7 RNA polymerasu
- Návrh a charakterizace adaptorového proteinu
- Vývoj tzv. beněčné metodologie, zahrnující výše zmíněnou T7 RNA polymerasu a adaptorový protein, která umožní produkci funkcionalizovaných nanočástic na bázi exosomů nesoucích mRNA
- Návrh CRISPR/Cas9 nukleasy degradující cccDNA viru žloutenky typu B
- Vysoká produkce IVT-mRNA kódující danou CRISPR/Cas9
- Vývoj tzv. “syntetického” přístupu nanočástic obsahujících IVT-mRNA kódující CRISPR/Cas9 a její následné obalení liposomům podobnými nanočásticemi s cílovací adresou

2019-2022

- Testování biologické aktivity vyvinutých nanočástic ve tkáňových kulturách. Optimalizace nejúčinnější procedury přípravy nanočástic pro přenos CRISPR/Cas9 mRNA nebo DNA aptamerů

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp		<i>Nature Communications</i>
2018	2		<i>PNAS</i>
2019	2		<i>Cell Reports</i>
2020	2		<i>Scientific Reports</i>
2021	2		<i>Nucleic Acids Research</i>
2022	2		<i>Angewandte Chemie International Edition</i>
			<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
			<i>Nanotoday</i>
			<i>Nanoscale, international journal of nanomedicine</i>
Celkem	10		

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v následujících oblastech: Buněčně založené vesikuly specifického cílení
2017	0	0	
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	1	1	
2021	0	0	
2022	0	0	
Celkem	1	1	

Zahraniční spolupráce

- Ecole Polytechnique Lausanne, Switzerland, (laboratoř Christiana Heinise).
- Gilead Sciences, vývoj nanočástic umožňujících cílenou editaci genomu