

Universitatea “Babeş-Bolyai”

Cluj-Napoca, România

TEZĂ DE ABILITARE

**INHIBAREA ȚINTITĂ A PROCESELOR
COORDONATE DE CĂTRE MICROMEDIUL
TUMORAL
PRIN UTILIZAREA UNOR FORMULĂRI
LIPOZOMALE**

Dr. MANUELA BANCIU

2018

REZUMAT

Activitatea științifică, profesională și academică a Manuelei Banciu, prezentată în această teză de abilitare abordează arii tematice interdisciplinare din domeniul Științelor Biologice (Biochimie, Imunologie și Biologie Moleculară), Bionanotehnologiilor, precum și din domeniul Științelor Biomedicale (Oncobiologie, Imunologia Cancerului). Activitatea de cercetare descrisă în cadrul acestei teze (efectuată în perioada 2008-2018) este rezultatul consolidării cunoștințelor de Bionanotehнологii Terapeutice, asimilate de către Manuela Banciu în urma efectuării doctoratului la Universitatea Utrecht din Olanda. Astfel cele mai importante realizări științifice ale cercetării coordonate de către Manuela Banciu au fost centrate pe dezvoltarea unor nanoterapii țintite anticanceroase bazate pe suprimarea proceselor protumorale coordonate de către micromediul tumoral. Valoarea științifică a acestor rezultate este dovedită prin publicațiile în reviste cu factor de impact încadrate pe Web of Science Thomson Reuters în următoarele arii de cercetare: Biochimie și Biologie Moleculară, Oncologie, Farmacologie, Farmacie. Teza de abilitare intitulată: **“Inhibarea țintită a proceselor coordonate de către micromediul tumoral prin utilizarea unor formulări lipozomale”** prezintă rezultate originale obținute în decursul a 11 ani de studii (2008-2018), fiind finanțate prin intermediul a 3 proiecte naționale (PN II – RU 387/2010, contract 145/2010; PN-II-PTPCCA-2011-3-2-1060, contract 95/2012 și PN-II-RU-TE-2014-4-1191, contract 235/01.10.2015) câștigate de către autoarea acestei lucrări.

Partea principală a tezei de abilitare este constituită din capitolul nr. 2 și descrie cele mai relevante realizări științifice ale Manuelei Banciu, acestea fiind centrate în jurul a trei direcții de cercetare:

- 1) studiul efectelor modulatoare ale interacțiunii dintre macrofagele asociate tumorii (*engl.* tumor-associated macrophages, TAMs) și celulele tumorale asupra proceselor care inițiază și întrețin creșterea tumorală;
- 2) elucidarea principalelor mecanisme moleculare ale citotoxicității agenților farmacologici testați, în vederea dezvoltării unor terapii țintite ale cancerului;
- 3) dezvoltarea unor terapii țintite anticanceroase prin utilizarea strategiilor de “reeducare a TAMs”.

Studiile oncologice anterioare (incluzând cercetarea doctorală a autoarei) au demonstrat necesitatea celulelor canceroase de a menține celulele sistemului imunitar în stare suprimate pentru a se asigura dezvoltarea și evoluția tumorii maligne. Dintre celulele sistemului imunitar

infiltrate în tumoră, macrofagele „educate” - TAMs dețin un rol primordial în toate procesele care întrețin creșterea și dezvoltarea tumorilor cum ar fi, angiogeneza, inflamația, stresul oxidativ, capacitatea de invazie și metastazare a tumorii maligne. În ceea ce privește prima direcție de cercetare, studiile coordonate de către Manuela Banciu au dovedit următoarele:

- Rolul stresului oxidativ coordonat de către TAMs în dezvoltarea a două tipuri de tumori maligne solide: melanomul murin B16.F10 și carcinomul murin de colon C26;
- Legătura dintre stresul oxidativ coordonat de către TAMs și capacitatea angiogenică a micromediului tumoral.

Aceste date au fost publicate în următoarele articole din reviste cu factor de impact, în calitate de autor principal:

- Alupei MC, Licarete E, Patras L, **Banciu M.** (2015). Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Lett* 356 (2): 946-952.
- Luput L, Licarete E, Sesarman A, Patras L, Alupei MC, **Banciu M.** (2017). Tumor-associated macrophages favor C26 murine colon carcinoma cell proliferation in an oxidative stress-dependent manner. *Oncol Rep* 37(4): 2472-2480.

O altă direcție majoră de cercetare a constat în investigarea principalelor mecanisme moleculare ale citotoxicității unor agenți farmacologici care ar putea fi ulterior utilizați în terapii țintite anticanceroase. În acest sens, grupul de cercetare condus de către Manuela Banciu a investigat diferite tipuri de statine – agenți medicamentoși a căror acțiune farmacologică principală nu este de tip antitumoral ci este de tip hipocolesterolemiant. Cu toate acestea, statinele la concentrații de 100-500 ori mai mari decât cele necesare pentru exercitarea efectelor de suprimare a sintezei *de novo* a colesterolului, posedă acțiuni antitumorale care ar putea fi valorificate în viitoarele terapii țintite anticanceroase.

Cele mai importante descoperiri ale acestor studii au fost:

- Numai statinele cu caracter lipofil exercită efecte citotoxice asupra celulelor de melanom murin B16.F10;
- Principalul mecanism al citotoxicității statinelor lipofile constă în suprimarea puternică a exprimării subunității α a factorului de transcriere indus de hipoxie 1 (HIF-1 α) în celulele de melanom *in vitro*. Aceasta proteină fiind supraexprimată doar în celulele de melanom, unde îndeplinește un rol esențial pentru menținerea fenotipului malign, ar putea reprezenta o țintă moleculară pentru viitoarele abordări terapeutice bazate pe administrarea statinelor lipofile.

Tot în cadrul acestei direcții de cercetare, s-a studiat implicarea micromediului tumoral în mecanismele citotoxicității unor agenți anticanceroși clasici. Astfel, s-a testat influența TAMs

asupra răspunsului celulelor de carcinom de colon murin C26 la 5-fluorouracil (5-FU), un agent citostatic foarte frecvent administrat în stadiile avansate ale cancerului colorectal.

Cele mai importante date legate de efectele modulatorii ale macrofagelor intratumorale asupra citotoxicității 5-FU în celulele de cancer de colon sunt prezentate mai jos.

- TAMs au un rol dual în răspunsul acestor celule canceroase la tratamentul cu agentul citostatic testat. Astfel, deși macrofagele amplifică acțiunile antiangiogenice ale 5-FU asupra micromediului tumoral, celulele tumorale sunt protejate de către TAMs împotriva efectelor prooxidante ale agentului citostatic;

- Aceste date sugerează necesitatea combinării tratamentelor bazate pe 5-FU cu administrarea unor agenți care previn acțiunea protectivă a macrofagelor asupra celulelor de cancer de colon.

Rezultatele studiilor prezentate mai sus au fost publicate în următoarele articole din reviste cu factor de impact, în calitate de autor principal:

- Alupei MC, Licarete E, Cristian FB, **Banciu M.** (2014). Cytotoxicity of lipophilic statins depends on their combined actions on HIF-1 α expression and redox status in B16.F10 murine melanoma cells. *Anticancer Drugs* 25(4): 393-405.

- Licarete E, Sesarman A, Rauca VF, Luput L, Patras L, **Banciu M.**(2017). HIF-1 α acts as a molecular target for simvastatin cytotoxicity in B16.F10 melanoma cells cultured under chemically induced hypoxia. *Oncol Lett* 13(5): 3942-3950.

- Patras L, Sesarman A, Licarete E, Luca L, Alupei MC, Rakosy-Tican E, **Banciu M.** (2016) Dual role of macrophages in the response of C26 colon carcinoma cells to 5-fluorouracil administration. *Oncol Lett* 12(2):1183-1191.

Elucidarea mecanismelor moleculare ale citotoxicității statinelor precum și demonstrarea rolului micromediului tumoral în sensibilitatea celulelor canceroase la chimioterapie (rolul macrofagelor în răspunsul celulelor de carcinom de colon murin la 5-fluorouracil) deschid noi perspective pentru dezvoltarea unor terapii țintite ale cancerului bazate pe reeducarea TAMs. Cu alte cuvinte, aceste strategii terapeutice ar putea “reeduca” TAMs să lupte împotriva celulelor tumorale. În acest sens, grupul de cercetare condus de către Manuela Banciu a testat diferite tipuri de terapii anticanceroase bazate pe încorporarea agenților farmacologici în lipozomi cu timp prelungit în circulația sangvină (*engl.* long-circulating liposomes (LCL)). Acest tip de lipozomi sunt înzestrați cu capacitatea de țintire pasivă a tumorilor. Totodată studiile anterioare incluzând cercetarea de doctorat a autoarei, au demonstrat că acești LCL au un tropism natural pentru macrofagele infiltrate în tumoră. Ca urmare, toate procesele protumorale guvernate de către TAMs ar putea fi afectate semnificativ prin utilizarea unor agenți anticanceroși vectorizați pasiv la nivelul tumorii cu ajutorul LCL. Astfel, a fost testată eficacitatea antitumorală a unei terapii bazate

pe administrarea intravenoasă a simvastatinei (o statină lipofilă) (SIM) încorporată în LCL (nanolipozomi acoperiți cu polietilenglicol (PEG)) (LCL-SIM) asupra a două modele tumorale murine: melanomul B16.F10 și carcinomul de colon C26. De asemenea, a fost investigată activitatea antitumorală a unei terapii combinate bazată pe țintirea simultană a TAMs cu un agent antiinflamator- fosfatul disodic de prednisolon încapsulat în LCL (LCL-PLP) cât și a celulelor canceroase C26 cu 5-fluorouracil încapsulat în LCL (LCL-5-FU).

Cele mai importante descoperiri ale acestor cercetări sunt redată după cum urmează:

- Terapia bazată pe LCL-SIM prezintă o eficacitate antitumorală considerabilă asupra creșterii ambelor tipuri de tumori.

- Mecanismul principal care stă la baza activității antitumorale a LCL-SIM este dependent de tipul de cancer. Astfel, în cazul melanomului murin B16.F10, cauza principală a activității antitumorale a LCL-SIM a fost inhibarea puternică a stresului oxidativ intratumoral coordonat de către TAMs și a potențialului metastatic al acestui tip agresiv de cancer. În cazul carcinomului de colon murin C26, activitatea antitumorală a LCL-SIM s-a bazat pe acțiunile sale antiangiogenice și antiinflamatoare asupra micromediului tumoral dar și pe efectele sale citotoxice directe exercitate asupra celulelor canceroase.

- Eficacitatea antitumorală a terapiei combinate bazate pe administrarea simultană a LCL-PLP și LCL-5-FU asupra carcinomului de colon murin C26 a fost superioară monoterapiilor bazate fie pe administrarea LCL-PLP sau doar a LCL-5-FU.

- Activitatea antitumorală a terapiei combinate testate se bazează pe inhibarea angiogenezei și inflamației tumorale.

- Aceste efecte antiangiogenice și antiinflamatoare ale terapiei combinate lipozomale sunt favorizate de fenotipul antineoplazic al micromediului tumoral creat în urma administrării LCL-PLP și LCL-5-FU.

Aceste date au fost publicate în articole din reviste cu factor de impact după cum urmează:

- Alupei MC, Licarete E, Patras L, **Banciu M.** (2015). Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Lett* 356 (2): 946-952 (autor principal);

- Porfire A, Tomuta I, Muntean D, Luca L, Licarete E, Alupei MC, Achim M, Vlase L, **Banciu M.** (2015). Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *J Liposome Res* 25(4): 261-269 (autor principal);

- Luput L, Licarete E, Drotar DM, Nagy AL, Sesarman A, Patras L, Rauca VF, Porfire A, Muntean D, Achim M, Tomuta I, Vlase L, Catoi C, Dragos N, **Banciu M.** (2017). *In Vivo* Double Targeting of C26 Colon Carcinoma Cells and Microenvironmental Protumor Processes Using Liposomal Simvastatin. *J Cancer* 9(2): 440-449 (autor principal);

- Achim M, Tomuta I, Muntean D Porfire A, Tefas LR, Patras L, Licarete E, Alupei MC, Vlase, L, **Banciu, M** (2017) Optimization and *in vitro* evaluation of 5-fluorouracil - loaded long - circulating liposomes, *FARMACIA 65 (1)*: 82-91 (autor principal);

- Patras L, Sylvester B, Luput L, Sesarman A, Licarete E, Porfire A, Muntean D, Drotar DM, Rusu AD, Nagy AL, Catoi C, Tomuta I, Vlase L, **Banciu M**, Achim M (2017) Liposomal prednisolone phosphate potentiates the antitumor activity of liposomal 5-fluorouracil in C26 murine colon carcinoma *in vivo Cancer Biol Ther 18(8)*: 616-626 (autor principal, autor de corespondență);

- Sylvester B, Porfire A, Muntean DM, Vlase L, Lupuț L, Licarete E, Sesarman A, Alupei MC, **Banciu M**, Achim M, Tomuță I (2018) Optimization of prednisolone-loaded long-circulating liposomes via application of Quality by Design (QbD) approach. *J Liposome Res 28(1)*: 49-61 (co-autor);

De asemenea, în strânsă legătură cu principalele direcții de cercetare dezvoltate în cadrul acestor studii, autoarea prezentei teze de abilitare a publicat un articol de sinteza, în care este prezentat stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește acțiunile antitumorale ale statinelor și respectiv, nanosistemele de vectorizare ale acestor agenți farmacologici la nivelul tumorilor solide. Datele de identificare ale acestui articol sunt:

- Licarete E, Sesarman A, **Banciu M**. (2015) Exploitation of pleiotropic actions of statins by using tumor-targeted delivery systems, *J Microencapsul 32(7)*: 619-631.

Nu în ultimul rând, pe lângă valoarea aplicativă, cercetările efectuate i-au permis autoarei dezvoltarea unor colaborări științifice cu diferite grupuri de cercetare naționale și internaționale, atât în domeniul Științelor Biomedicale cât și în subdomeniile ale Științelor Biologice. În cadrul acestor colaborări, Manuela Banciu a coordonat studii cu privire la elucidarea mecanismelor moleculare ale unor compuși chimici cu potențial antitumoral; cercetări privind dezvoltarea unor sisteme nanoparticulate pentru terapia și diagnosticul bolilor inflamatoare cronice, precum și studii privind implicarea stresului oxidativ în procesele adaptative ale diferitelor organisme.

În ceea ce privește activitatea didactică, în prezent, Manuela Banciu coordonează cursurile și laboratoarele mai multor discipline predate studenților la nivel licență (Biochimie structurală și Biochimia metabolismului, Enzimologie), dar și la nivel Master (Metode biochimice și biofizice moderne, Bionanotehnologii, etc). Este important de menționat rolul important al cunoștințelor teoretice și practice achiziționate în cursul muncii de cercetare în consolidarea competențelor didactice ale autoarei acestei teze de abilitare. Astfel, în urma desfășurării activității științifice, Manuela Banciu și-a însușit noțiuni teoretice și deprinderi practice din

domeniul Biochimiei (determinări enzimatică, HPLC, purificare de proteine prin cromatografie de joasă presiune, prin centrifugare în gradient de densitate, electroforeză în gel de poliacrilamidă mono- și bidimensională, caracterizarea proteinelor prin tehnici spectrofotometrice și spectrofluorimetrice, prepararea de vezicule membranare); Bionanotehnologiilor (prepararea și caracterizarea lipozomilor și nanoparticulelor polimerice); Imunologiei (ELISA, Western blotting, colorarea și microscopia de imunofluorescență, purificarea de anticorpi prin cromatografie de afinitate și prin imunoprecipitare, imunohistochimie), Proteomicii (array pentru proteine).

Partea finală a tezei de abilitare a fost dedicată planurilor viitoare de dezvoltare științifică și profesională ale autoarei. Dezvoltarea pe plan științific a autoarei reprezintă o aprofundare a realizărilor obținute în timpul cercetării postdoctorale. Astfel, principalul scop al cercetării viitoare va urmări dezvoltarea unor terapii antitumorale țintite utilizând modalitățile de comunicare intercelulară, proprii tumorilor solide cum ar fi interacțiunea dintre celulele canceroase și cele ale sistemului imunitar infiltrate în tumoră sau prin intermediul veziculelor extracelulare. Cu alte cuvinte, aceste terapii vor încerca un proces de reeducare a celulelor sistemului imunitar în lupta anticanceroasă și vor utiliza veziculele extracelulare produse de către celulele tumorale pe post de "cai troieni" pentru vectorizarea agenților citotoxici în mediul tumoral. În acest sens, în 2017, autoarea a câștigat un proiect național intitulat "Modalitățile de comunicare intercelulară intratumorală -surse de inspirație pentru viitoarele terapii țintite ale cancerului" (cod: PN-III-P4-ID-PCE-2016-0342, nr. contract: 91/2017) care a permis începerea acestei cercetări. De asemenea, autoarea intenționează să își consolideze un grup de cercetare care va fi specializat să desfășoare cercetări interdisciplinare cu privire la explorarea modalităților de comunicare intercelulară intratumorală, utilizând o gamă vastă de metode biochimice, moleculare, bioinformatică, aplicate modelelor animale dezvoltate *in vitro* și *in vivo*.

Pe plan academic, autoarea dorește să îmbunătățească și să actualizeze cursurile pe care le coordonează, iar împreună cu un grup de colaboratori, să conceapă și să redacteze o culegere de metode biochimice și moleculare care va include protocoalele experimentale optimizate în cadrul activității de cercetare. În urma admiterii sale în Școala Doctorală de Biologie Integrativă, Manuela Banciu intenționează să introducă un curs doctoral nou, intitulat "Stresul oxidativ în cercetarea biomedicală și biologică" care va aborda aspecte multiple ale implicării stresului oxidativ în diferite patologii dar și în procese fiziologice legate de îmbătrânire, mecanismele de apărare și cele adaptative ale organismelor.