

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-15-0485

Vysoko selektívna liečba nádorových ochorení: komplexy endogénnych lipoproteínov s DARPinmi ako nová generácia transportných systémov pre cieleň transport liečiv (DARLINK)

Zodpovedný riešiteľ **doc. Mgr. Daniel Jancura, PhD.**

Príjemca

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Prírodovedecká fakulta

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra biofyziky, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach a Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park UPJŠ v Košiciach

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Žiadne zahraničné pracovisko nebolo priamo zahrnuté do riešenia projektu. Nepriamo sme počas riešenia projektu spolupracovali na konkrétnych úlohách projektu s pracoviskom prof. Pluckthuna z University of Zurich (Švajčiarsko) a laboratóriom Dr. Wagniersa z EPFL Lausanne (Švajčiarsko).

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Počas projektu nebol udelený žiaden patent resp. podaná patentová prihláška. Uvažujeme o možnosti podať patentovú prihlášku na nami vyvinutý transportný systém liečiv DARPin-linker-LDL.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Najvýznamnejšie publikácie projektu (10 najvýznamnejších publikácií)

J. Joniová, M. Rebič, A. Strejčková, V. Huntošová, J. Staničová, D. Jancura, P. Miškovský and G. Bánó. Formation of large hypericin aggregates in giant unilamellar vesicles - experiments and modeling. Biophys. Journal 112, 966-975 (2017)

P. Sramkova, A. Zahoranova, Z. Kronekova, A. Siskova and J. Kronek. Poly(2-oxazoline) hydrogels by photoinduced thiol-ene "click" reaction using different dithiol crosslinkers. Journal of Polymer Research 24, 82 (2017)

S. Datta, A. Jutkova, P. Sramkova, L. Lenkavska, V. Huntosova, D. Chorvat, P. Miskovsky, D. Jancura and J. Kronek. Unravelling the excellent chemical stability and bioavailability of solvent responsive curcumin-loases 2-ethyl-2-oxazoline-graft-2-(4-dodecyloxyphenyl)-2-oxazoline copolymer nanoparticles for drug delivery. Biomacromolecules 19, 2459-2471 (2018)

S. Tomkova, M. Misuth, L. Lenkavska, P. Miskovsky and V. Huntosova. In vitro identification of mitochondrial oxidative stress production by time-resolved fluorescence imaging of glioma cells. BBA-Molecular Cell Research 1865, 616-628 (2018)

S. Datta, A. Hovan, A. Jutkova, S.G. Kruglik, D. Jancura, P. Miskovsky and G. Bano.

Phosphorescence kinetics of singlet oxygen produced by photosensitization in spherical nanoparticles. Part II. The case of hypericin-loaded low-density lipoprotein particles. *Journal of Physical Chemistry B*, 122, 5154-5160 (2018)

L. Blascakova, D. Horvath, D. Belej, G. Wagnieres, P. Miskovsky, D. Jancura and V. Huntosova. Hypericin can cross barriers in the chicken's chorioallantoic membrane model when delivered in low-density lipoproteins. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 23, 306-313 (2018)

D. Horvath and B. Brutovsky. A new conceptual framework for the therapy by optimized multidimensional pulses of therapeutic activity. The case of multiple myeloma model. *Journal of Theoretical Biology*, 454, 292-309 (2018)

L. Lenkavská, L. Blascakova, Z. Jurasekova, M. Macajova, B. Bilcik I. Cavarga, P. Miskovsky and Huntosova. Benefits of hypericin transport and delivery by low- and high-density lipoproteins to cancer cells: From in vitro to ex ovo. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 25, 214-224 (2019)

A. Jutková, D. Chorvat, P. Miskovsky, D. Jancura and S. Datta. Encapsulation of anticancer drug curcumin and co-loading with photosensitizer hypericin into lipoproteins investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Int. J. Pharmaceutics* 564, 369-378 (2019)

M. Petrencakova, F. Filandr, A. Hovan, G. Yassaghi, P. Man, T. Kozar, M.S. Schwer, D. Jancura, A. Pluckthun, P. Novak, P. Miskovsky, G. Bano and E. Sedlak. Photoinduced damage of AsLOV2 domain is accompanied by increased singlet oxygen production due to flavin dissociation. *Scientific Reports* 10, art. numb. 4119 (2020)

Uplatnenie výsledkov projektu

Získané výsledky projektu, predovšetkým konštrukcia a fyzikálno-chemická charakterizácia komplexov DARPin-linker-LDL, tvoria veľmi solídnu bázu pre pokračovanie výskumu využitia týchto komplexov pri cielelom transport liečiv do nádorových tkanív. Nami pripravené DARPin-linker-LDL nanočastice, schopné prenášať desiatky až stovky molekúl hydrofóbných/amfifilných protinádorových liečiv a schopné selektívnej väzby na HER-2 receptory nádorových buniek, by po úspešných in vivo experimentoch (tieto experimenty plánujeme realizovať v rámci nasledujúcich projektov) mohli výrazne prispieť k zefektívneniu a optimalizácii liečby nádorových ochorení prsníkov.

Výsledky nášho projektu v oblasti vývoja transportného systému liečiv využitím gradientových kopolymérov na báze poly(2-oxazolínov) ukazujú, že vlastnosti vytvorených poly(2-oxazolínových) polymérnych micel, vysoká stabilita v biologickom prostredí, nízka cytotoxicita a schopnosť akumulovať značné množstvo hydrofóbných resp. amfifilných liečiv (v našom prípade hypericín a kurkumín), predurčujú tieto polymérne micely pre ďalšie podrobné štúdium aplikácie týchto nanočastíc pre efektívny transport liečiv pri liečbe nádorových ochorení.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

V rámci projektu bol skonštruovaný stabilný nanočasticový systém LDL-dextrán, ktorý je schopný uchovávať a prenášať hydrofóbné a amfifilné liečivá (ako modelové zlúčeniny boli použité hypericín a kurkumín). Podarilo sa nám syntetizovať komplex DARPin (špecificky vyselektovaný pre HER-2 receptory)-linker-LDL, v ktorom je DARPin spojený s acetylovanými molekulami LDL prostredníctvom O-N-(6-maleimid dohexanyl) aminoetyl-O-3-(N-sukcinimidyl)-3-oxopropyl polyetylén glykolu. Rozmery týchto komplexov sa nachádzajú v intervale 25-30 nm a na povrchu jednej LDL častice sa nachádza 15-20 molekúl DARPinov. Tieto parametre jednoznačne naznačujú, že takéto nanočasticové komplexy majú značný potenciál pre efektívny cielelý transport liečiv do nádorových tkanív. Takto pripravené komplexy boli potom študované vzhľadom na ich záchyt bunkami bunkových línií s rôznymi hladinami exprese HER-2 receptorov U-87 MG, SK BR3 a BT474. Naše zistenia dokazujú, že prítomnosť špecifických DARPinov na povrchu transportných častíc výrazne zvyšuje selektivitu transportu liečiv do nádorových buniek s exprimovanými HER-2 receptormi.

V projekte sme sa venovali aj príprave nových typov transportných systémov pre kontrolované uvoľňovanie protirakovinových liečiv. Na prípravu týchto transportných systémov sme využili gradientové kopolyméry na báze poly(2-oxazolínov). Vlastnosti vytvorených poly(2-oxazolínových) polymérnych micel, vysoká stabilita v biologickom

prostredí, nízka cytotoxicita a schopnosť akumulovať značné množstvo hydrofóbných resp. amfifilných liečiv (v našom prípade hypericín a kurkumín), vedú k úvahám o ich možnej aplikácii pre efektívny transport liečiv pri liečbe nádorových ochorení.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

In the project, a stable nano-particle system LDL-dextran, which is able to incorporate and transport hydrophobic and amphiphilic drugs (hypericin and curcumin were used as model compounds), was constructed. Further, we have developed a complex DARPIn (specifically selected for the binding to HER-2 receptors)-linker-LDL suitable for the accumulation and transport of hydrophobic/amphiphilic molecules. The size of the nanoparticles are in the range 25-30 nm and 15-30 molecules of DARPins are located on the surface of LDL particle. Both these parameters suggest that this complex has potential to be a very effective transport system for targeted drug delivery. The prepared LDL-DARPIn complexes were subsequently tested for targeting to three cancerous cell lines with different level of expression of HER2 receptors, U-87 MG, SK BR3 a BT474. Our findings prove that the presence of specific DARPins on the surface of drug delivery system leads to a higher uptake of these transport systems by the cells with HER-2 receptors.

In the project we have also dedicated to the development of a new type of drug delivery systems for controlled release of anticancer drugs. For the preparation of such systems we have utilized copolymers based on poly(2-oxazolin). The properties of poly(2-oxazolin) polymeric micelles, the high thermodynamic and kinetic stability in biological surroundings, low cytotoxicity, and the ability to accumulate a large amount of hydrophobic/amphiphilic drugs (in our case hypericin and curcumin), lead to a proposition of their effective utilization for drug delivery in cancer treatment.