



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



**Anna Florczak**  
**Międzyuczelniane Centrum Nanobiomedyczne**  
**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

**Biodegradowalne jedwabne bionanokompozyty (SBC) do terapii celowanej i diagnostyki nowotworów**

**Wstęp:**

Leki przeciwnowotworowe w dawkach terapeutycznych podawane ogólnoustrojowo mogą powodować poważne skutki niepożądane. Równowaga pomiędzy korzyścią terapeutyczną a toksycznością leku jest często nie do zaakceptowania dla chorych. Dlatego też, prowadzone są obecnie intensywne badania w celu dostarczenia środków toksycznych bezpośrednio do komórek nowotworowych, oszczędzając inne komórki organizmu. Nadrzędnym celem pracy doktorskiej jest stworzenie i rozwijanie platformy dla dostarczania substancji czynnych selektywnie do komórek nowotworowych. Cząsteczkami transportującymi są sfery oparte na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym, co stwarza ogromny potencjał aplikacji rezultatów badań w praktyce klinicznej. Dzięki rozwojowi powyższej technologii bioinżynierowany jedwab stanie się „inteligentnym” biomateriałem przyszłości, a otrzymywany na skalę przemysłową wywoła rewolucję biotechnologiczną. Wyniki pracy doktorskiej, a także ich komercjalizacja i wprowadzenie na rynek, odpowiadają na potrzeby rynkowe regionu, gdyż celem jest podnoszenie jakości życia mieszkańców Wielkopolski. Jako że projekt badawczy kładzie ogromny nacisk na aspekt aplikacyjny otrzymywanych struktur i ich potencjalne zastosowanie w przyszłości w leczeniu pacjentów, niewątpliwie może przynieść korzyści dla województwa wielkopolskiego.

Unikalne właściwości mechaniczne nici pajęczej, a także biokompatybilność oraz biodegradowalność spowodowały intensywny rozwój technologii biomateriałów opartych na białkach jedwabiu pajęczego. Postęp badań naukowych hamowany był przez długi czas brakiem metod pozyskiwania odpowiedniej ilości materiału. Przełomem było opracowanie

technologii produkcji bioinżynierowanych pajęczych białek jedwabiu. Technologia ta polega na konstruowaniu sztucznych białek jedwabiu, których sekwencje oparte są na motywach konsensusowych białek naturalnych. Ponadto, białka inżynierowane genetycznie, można konstruować tak, aby nadać im „nowe” funkcje. Jedną z form bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego, którą można uzyskać poprzez wysolenie białek jedwabiu jonami fosforanowymi, jest sfera. Mikro- i nanosfery poddane stosownym modyfikacjom mogą łączyć cechy systemu dępot oraz celowanego dostarczania leków do wybranych komórek organizmu. Podczas procesu wytwarzania nośników, substancja czynna jest inkorporowana do jedwabnych sfer. Po dostarczeniu do komórek substancje aktywne są uwalniane, nośniki są enzymatycznie degradowane i usuwane z organizmu. Funkcjonalizacja bioinżynierowanego jedwabiu za pomocą peptydów rozpoznających swoiście receptory czy inne struktury występujące na komórce, pozwala na wytworzenie systemu celowanego dostarczania leków. Nie ulega wątpliwości, że powyższy schemat leczenia zrewolucjonizuje terapię nowotworów, jako łatwy i w pełni kontrolowany sposób na dostarczanie leków.

Koncepcję systemu dostarczania leków za pomocą jedwabnych nośników udowodniono wykorzystując model raka piersi charakteryzujący się nadekspresją receptora Her2. Do nośnika dołączono (na poziomie DNA) sekwencję nadającą funkcję rozpoznawania receptora Her2 na powierzchni komórek nowotworowych. Oczekiwany wynikiem końcowym badań jest stworzenie innowacyjnego systemu do rozpoznawania komórek nowotworowych w modelu eksperymentalnym dla celów diagnostycznych i terapeutycznych. Hybrydowe białka jedwabiu tworzące sfery i rozpoznające receptory komórkowe mają ogromny potencjał jako nośnik leków w celowanej terapii nowotworów. Sama zaś strategia biomateriałów opartych na hybrydowych białkach pajęczego jedwabiu może sprawdzić się nie tylko w przypadku raka piersi czy innych nowotworów, ale też w przypadku innych chorób.

Cele pracy doktorskiej:

Celem głównym jest opracowanie biokompatybilnego i biodegradowalnego systemu nośników przeznaczonych do celowanej terapii i diagnostyki nowotworów, opartych na jedwabnych biomateriałach.

Cele szczegółowe obejmują:

- i. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych.
- ii. Produkcja i oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.
- iii. Wytwarzanie i charakterystyka nośnika (sfery) opartego na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym.

- iv. Ocena biologicznych oddziaływań jedwabnych sfer kierowanych do komórek *in vitro*.
- v. Ocena biologicznych interakcji jedwabnych sfer kierowanych do komórek *in vivo*.

#### Wyniki:

W pierwszym etapie projektu doktorskiego skonstruowano wektory ekspresyjne kodujące sztuczne geny jedwabiu pajęczego z przyłączonymi domenami funkcyjnymi (domeny rozpoznające receptor Her2 ulegający nadekspresji na powierzchni komórek nowotworowych). Następnie bioinżynierowane białka jedwabiu wyprodukowano w dużej skali w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i oczyszczono metodą termicznej denaturacji. Białka analizowano w teście wiązania do receptora *in vitro* na ludzkich liniach komórek nowotworowych SKOV3 i SKBR3 oraz kontrolnych ludzkich fibroblastach MSU1.1. Wykazano swoiste wiązanie białek fuzyjnych z dołączoną domeną rozpoznającą receptor Her2. Ponadto, porównano zdolności wiązania poszczególnych wariantów białek jedwabiu do komórek Her2 pozytywnych. Wykazano, że najwydajniej wiążą się białka z dołączoną domeną funkcyjną na N-końcu, których użyto do dalszych badań.

W kolejnym etapie badań opracowano technologię wytwarzania nośników opartych na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczego. Funkcjonalizowane białka MS1 formowały sfery w trakcie procesu wysalania jonami fosforanowymi. Sfery charakteryzowano pod względem morfologii oraz wiązania do komórek. Te wytworzone z funkcjonalizowanego pajęczego jedwabiu MS1 wykazały istotny statystycznie wzrost wiązania do komórek z nadekspresją receptora Her2. Następnie, do jedwabnych sfer załadowano z wysoką wydajnością lek modelowy doksorubicynę. Funkcjonalizowane jedwabne sfery MS1 załadowane doksorubicyną powodowały istotne statystycznie ograniczenie żywotności komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z komórkami bez receptora Her2. Obserwowana cytotoksyczność nie była powodowana jedwabiem pajęczym.

W dalszym etapie projektu wprowadzono drugi typ białka bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego tj. MS2. Uzyskano nowe wektory ekspresyjne, po czym wyprodukowano i oczyszczono białka typu MS2. Następnie wytworzono sfery z mieszanek dwóch białek MS1 i MS2 oraz ich funkcjonalizowane warianty w różnych stosunkach procentowych. Sfery scharakteryzowano pod względem właściwości fizycznych i skuteczności wiązania oraz dostarczania leku do komórek nowotworowych. Sfery oparte na białkach MS1 i MS2 różniły się pod względem morfologii, stabilności, struktury drugorzędowej, potencjału dzeta oraz wiązania do komórek. Większa ilość białka MS2 w mieszance powodowała poprawę fizycznych właściwości sfer, jednak zmniejszała skuteczność wiązania do komórek. Dla

mieszanki 80/20% (funkcjonalizowane białka MS1/MS2) poziom wiązania był zachowany przy jednocześnie znacznym zwiększeniu stabilności sfer. Ww. cząsteczki użyto do inkorporacji dokсорubicyny. Opracowano profil ładowania i uwalniania leku. Wykazano, że sfery są zdolne do powolnego uwalniania leku, a czynnikiem przyspieszającym proces uwalniania jest niskie pH. Analizowano również potencjał dostarczania leku przenoszonego w sferach (o ulepszonych właściwościach fizycznych) do komórek nowotworowych i ich zabijania *in vitro*. Potwierdzono, że funkcjonalizowane sfery z dokсорubicyną powodowały spadek żywotności komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z komórkami Her2-negatywnymi oraz kontrolnymi sferami bez domen funkcyjnych.

Końcowa faza projektu doktorskiego dotyczyła badań *in vivo* wiązania i biodystrybucji jedwabnych sfer, a także oceny efektu terapeutycznego dokсорubicyny dostarczonej za pomocą jedwabnych sfer. Wstępne wyniki wykazały zwiększoną akumulację funkcjonalizowanych sfer jedwabiu pajęczego w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie. Ponadto wykazano, że dokсорubicyna dostarczana w sferach zapewniała swoisty efekt terapeutyczny w stosowanym modelu *in vivo*. Analiza histopatologiczna wykazała brak ogólnoustrojowej toksyczności leku dostarczanego w sferach.

#### Wnioski:

Otrzymane dotychczas wyniki wskazują, że zbudowanie systemu opartego na hybrydowych białkach jedwabiu pajęczego jest technicznie możliwe. Pajęczce jedwabie mogą być wytwarzane na dużą skalę w laboratorium, a w przyszłości na skalę przemysłową. Powyższa technologia nie jest toksyczna w badaniach *in vitro* i *in vivo*. W trakcie pracy nad projektem zrealizowano już liczne cele szczegółowe, co więcej, otrzymano pozytywne i dobrze rokujące jeśli chodzi o ich zastosowanie w praktyce rezultaty. Badania zawarte w rozprawie doktorskiej potwierdziły ogromny potencjał jedwabnych sfer w dostarczaniu środka terapeutycznego do specyficznego mikrośrodowisku guza. Ponadto, jedwabne nośniki mogą łączyć funkcje terapeutyczne i diagnostyczne. Obrazowanie umożliwia monitorowanie ich działania w organizmie ludzkim.