

Anna Florczak

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Mackiewicz

Promotor pomocniczy: dr n. biol. Hanna Dams-Kozłowska

MIĘDZYUCZELNIANE CENTRUM NANOBIOMEDYCZNE
UNIwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ZAKŁAD IMMUNOLOGII NOWOTWORÓW
KATEDRA BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ
UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2014

Rodzicom

*Bardzo serdecznie dziękuję Promotorowi
Pani Dr. n. biol. Hannie Dams-Kozłowskiej
za naukową opiekę i nieocenione wsparcie merytoryczne,
a przede wszystkim za okazaną cierpliwość i życzliwość.*

*Serdeczne podziękowania składam Promotorowi
Panu Prof. dr. hab. n. med. Andrzejowi Mackiewiczowi
za umożliwienie realizacji projektu,
wrozumiałość i pomoc w trakcie wykonywania pracy doktorskiej.*

*Dziękuję Panu Prof. dr. hab. Stefanowi Jurdze
za umożliwienie realizacji projektu.*

*Bardzo dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Diagnostyki i Immunologii Nowotworów
i Katedry Biotechnologii Medycznej
za wszechstronną pomoc
oraz stworzenie wyjątkowej atmosfery pracy.*

*Dziękuję Koleżankom i Kolegom
z Międzyuczelnianego Centrum NanoBioMedycznego
za wsparcie, koleżeńskie rady i miłą atmosferę.*

Spis treści

Wykaz skrótów.....	7
1. Wstęp.....	10
1.1 Choroby nowotworowe piersi	10
1.1.1 Epidemiologia	10
1.1.2 Leczenie nowotworów piersi.....	11
1.1.3 Nowotwory Her2-pozytywne	13
1.1.4 Leczenie nowotworów Her2-pozytywnych.....	15
1.2 Nanosystemy dostarczania leków w terapii nowotworów	17
1.2.1 Biernie dostarczanie leków.....	18
1.2.2 Czynne dostarczanie leków	19
1.2.3 Rodzaje nanocząstek do dostarczania leków	23
1.2.4 Zalety i ograniczenia stosowania nanocząstek	25
1.3 Jedwab pajęczycy.....	27
1.3.1 Wprowadzenie.....	27
1.3.2 Co to jest jedwab	28
1.3.3 Rodzaje i właściwości jedwabiu pajęczyczego.....	28
1.3.4 Budowa gruczołów przednich na przykładzie gruczołu ampulkowatego większego.....	30
1.3.5 Budowa nici wiodącej	31
1.3.6 Właściwości mechaniczne jedwabiu	34
1.3.7 Biotechnologiczne wytwarzanie jedwabiu pajęczyczego	35
1.3.8 Wytwarzanie biomateriałów opartych na jedwabiu pajęczyczym	43
1.3.9 Zastosowania biomedyczne jedwabnych biomateriałów.....	45
2. Założenia i cel pracy.....	48
3. Materiały i metody	49
3.1 Hodowle komórkowe	49
3.1.1 Ludzkie linie komórkowe.....	49
3.1.2 Mysie linie komórkowe.....	49
3.2 Przygotowanie mysich komórek D2F2 i D2F2/E2 zawierających gen lucyferazy	50
3.3 Ocena ekspresji genu Her2.....	50
3.4 Konstrukcja plazmidów kodujących funkcjonalizowane białka jedwabiu pajęczyczego.....	50
3.5 Produkcja białek jedwabiu pajęczyczego.....	51
3.5.1 Przygotowanie bakterii BLR (DE3)	51

3.5.2	Ekspresja białek jedwabiu pajęczego w dużej skali	52
3.6	Oczyszczanie białek jedwabiu pajęczego	52
3.7	Przygotowanie kompleksów białka z fluorescencyjnymi kulkami	53
3.7.1	Przyłączenie białek do kulek fluorescencyjnych modyfikowanych grupami- COOH	53
3.7.2	Przyłączenie białek do kulek fluorescencyjnych modyfikowanych grupami-NH ₂	54
3.8	Znakowanie białek jedwabiu znacznikami fluorescencyjnymi	54
3.9	Wytwarzanie jedwabnych sfer	55
3.10	Potencjał dzeta jedwabnych sfer	55
3.11	Inkorporacja doksorubicyny do sfer	55
3.12	Uwalnianie doksorubicyny ze sfer	56
3.13	Metody spektrofotometryczne	56
3.13.1	Stężenie białka	56
3.13.2	Mętność sfer w roztworze	57
3.13.3	Ładowanie i uwalnianie Dox	57
3.14	Metody spektrofluorometryczne	57
3.15	Metody mikroskopowe	57
3.15.1	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	57
3.15.2	Mikroskopia fluorescencyjna	58
3.15.3	Mikroskopia konfokalna	58
3.16	Cytometria przepływowa	59
3.17	Test cytotoksyczności MTT	60
3.18	Obrazowanie molekularne	60
3.19	Model mysich nowotworów piersi BALB/c	61
3.20	Badanie histopatologiczne	61
3.21	Analiza statystyczna	61
4.	Wyniki	63
4.1	Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych MS1	63
4.2	Produkcja białka jedwabiu pajęczego MS1 i jego funkcjonalizowanych wariantów	66
4.3	Oczyszczanie białek MS1	67
4.4	Ocena swoistości wiązania funkcjonalizowanych białek	68
4.4.1	Immunohistochemiczna charakterystyka komórek	68
4.4.2	Analiza <i>in vitro</i> wiązania kompleksów jedwab–kulki fluorescencyjne do komórek	69
4.5	Wytwarzanie jedwabnych sfer	71
4.6	Inkorporacja doksorubicyny (Dox) do sfer	72

4.7	Uwalnianie Dox ze sfer	74
4.8	Analiza <i>in vitro</i> wiązania sfer do komórek.....	74
4.8.1	Cytometria przepływowa.....	74
4.8.2	Mikroskop konfokalny	76
4.8.3	Internalizacja sfer i ich dystrybucja w czasie	77
4.8.4	Dystrybucja Dox <i>in vitro</i>	77
4.9	Ocena cytotoksyczności sfer kontrolnych i ładowanych Dox	78
4.10	Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych kodujących warianty białek MS2	80
4.11	Ekspresja bioinżynierowanych jedwabi MS2.....	83
4.12	Oczyszczanie białek jedwabiu pajęczego MS2	84
4.13	Wytwarzanie jedwabnych sfer MS2.....	85
4.14	Analiza <i>in vitro</i> wiązania sfer MS2 do komórek.....	86
4.15	Wytwarzanie jedwabnych sfer z mieszanek MS1 i MS2	86
4.16	Ocena wiązania sfer do komórek za pomocą cytometrii przepływowej	89
4.17	Internalizacja sfer MS2 do komórek i ich dystrybucja w czasie	91
4.18	Charakterystyka właściwości fizycznych sfer utworzonych z mieszanek białek MS1/MS2 (80/20%).....	92
4.18.1	Potencjał dzeta.....	92
4.18.2	Stabilność	93
4.19	Ładowanie sfer mieszanek MS1/MS2 (80/20%) lekiem Dox i uwalnianie Dox.....	94
4.20	Ocena cytotoksyczności sfer mieszanek MS1/MS2 (80/20%) ładowanych Dox.....	96
4.21	Przygotowanie komórek transfekowanych genem lucyferazy	97
4.22	Analiza <i>in vitro</i> wiązania sfer do komórek D2F2/E2 i D2F2.....	98
4.23	Eksperymentalny model <i>in vivo</i> mysich nowotworów piersi – badania wstępne	99
4.23.1	Dystrybucja jedwabnych sfer <i>in vivo</i>	99
4.23.2	Terapia.....	107
5.	Dyskusja	112
6.	Wnioski	128
7.	Streszczenie.....	129
8.	Abstract	132
9.	Literatura	135

Wykaz skrótów

- ADCC** (ang. *antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna do przeciwciał
- A. diadematus** (łac. *Araneus diadematus*) – pająk krzyżak ogrodowy
- ADF** (ang. *Araneus diadematus fibroin*) – białko jedwabiu nici pająka krzyżaka ogrodowego
- Ala** – alanina
- AP** (ang. *alkaline phosphatase*) – fosfataza alkaliczna
- ASR** – współczynnik standaryzowany zachorowalności
- ATTO 647N** – fluorofor (dostępny komercyjnie)
- BCT** (ang. *Breast Conservative Treatment*) – oszczędzające leczenie piersi
- BMP-2** (ang. *bone morphogenetic protein-2*) – białko morfogenetyczne kości
- B. mori** (łac. *Bombyx mori*) – jedwabnik morwowy
- BSA** (ang. *bovine serum albumin*) – albumina bydlęca
- CD** (ang. *cluster of differentiation*) – antygen różnicowania
- CDMP1** (ang. *cartilage-derived morphogenetic protein-1*) – fragment białka macierzy dentyiny 1
- cDNA** (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA
- CLSM** (ang. *confocal laser scanning microscope*) – konfokalny laserowy mikroskop skaningowy
- ConA** (ang. *concanavalin A*) – konkanawalina
- CPP** (ang. *cell penetrating peptides*) – peptydy penetrujące komórki
- DAPI** (ang. *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol, barwnik kwasów nukleinowych
- DMEM** (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – modyfikowana pożywka hodowlana Eagla
- DMSO** (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- DNA** (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy
- dNTP** (ang. *triphosphate deoxynucleotide*) – trójfosforan deoksyrybonukleotydu
- Dox** (ang. *doxorubicin*) – doksorubicyna
- E. coli** (łac. *Escherichia coli*) – pałeczka okrężnicy
- EGF** (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu
- ELP** (ang. *elastin-like protein*) – fragment białka elastyny
- EPR** (ang. *enhanced permeability and retention effect*) – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji
- ER** (ang. *endoplasmic reticulum*) – retikulum endoplazmatyczne
- FA** (ang. *folic acid*) – kwas foliowy
- Fab** (ang. *fragment, antigen binding*) – fragment przeciwciała wiążący antygen
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca
- FDA** (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków
- FITC** (ang. *fluorescein isothiocyanate*) – izotiocyanian fluoresceiny

- Flag** (ang. *flagelliform*) – białko jedwabiu łownego
- FTIR** (ang. *Fourier transform infrared*) – spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera
- G-418** – antybiotyk genetyczna
- GFP** (ang. *Green Fluorescent Protein*) – białko zielonej fluorescencji
- Gly** – glicyna
- H2.1** – peptyd MYWGDSHWLQYWYE
- H2.2** – peptyd LTVSPWY
- HA** (ang. *hydroxyapatite*) – hydroksyapatyt
- HEPES** (ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) – kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy
- HER** (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*) – receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka
- Her2** – członek rodziny receptorów HER
- HFIP** (ang. *hexafluoroisopropanol*) – heksafluoroizopropanol
- HPMA** (ang. *N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide*) – N-(2-hydroksypropylo) metakrylamid
- IC₅₀** (ang. *half maximal inhibitory concentration*) – wskaźnik odporności komórek
- IgG** (ang. *immunoglobulin G*) – przeciwciało
- IPTG** (ang. *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) – izopropylo-β-D-1-tiogalaktopiranozyd
- kDa** (kilodalton) – jednostka masy molowej
- LB** (*Luria Bertani*) – pożywka do hodowli bakterii
- L. hesperus*** (łac. *Latrodectus hesperus*) – pająk czarna wdowa
- LUC** (ang. *luciferase*) - lucyferaza
- MALDI-TOF** (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*) – spektroskopia mas
- MAPK** (ang. *mitogen-activated protein kinases*) – kinaza białka aktywowanego mitogenem
- MaSp** (ang. *major ampullate spidroin*) – białko jedwabiu nici wiodącej
- MiSp** (ang. *minor ampullate spidroin*) – białko jedwabiu pomocniczego
- MDR** (ang. *multidrug resistance gene*) – gen kodujący białko odpowiedzialne za lekooporność
- mRNA** (ang. *messenger RNA*) – matrycowy RNA
- MS1** – bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego oparte na MaSp1 pająka *N. clavipes*
- MS2** – bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego oparte na MaSp2 pająka *N. clavipes*
- MTS** (ang. *mitochondrial targeting signal*) – sygnał kierujący do mitochondrium *N. clavipes* (łac. *Nephila clavipes*) – pająk jedwabny
- NLS** (ang. *nuclear localization signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej
- NR** (ang. *nonrepetitive region*) – region niepowtarzający się
- OD** (ang. *optical density*) – gęstość optyczna
- P. pastoris*** (łac. *Pichia pastoris*) – drożdże

- PBS** (ang. *phosphate buffered saline*) – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami
- PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PDGFR** (ang. *platelet-derived growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego
- PEG** (ang. *polyethylene glycol*) – glikol polietylenowy
- PFA** (ang. *paraformaldehyde*) – paraformaldehyd
- PGA** (ang. *polyglycolic acid*) – kwas poli-l-glutaminowy
- PI3K** (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
- PLC γ** (ang. *phospholipase C gamma*) – fosfolipaza C- γ
- PLGA** (ang. *poly(lactic-co-glycolic acid)*) – polimer kwasu mlekowego i glikolowego
- PTH** (ang. *parathormon*) – parathormon
- pz** – par zasad
- R** – receptor
- RES** (ang. *reticuloendothelial system*) – system retikuloendotelialny
- RGD** (ang. *arginylglycylaspartic acid*) – tripeptyd wiążący integryny
- RNA** (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy
- ryc.** – rycina
- scFv** (ang. *single-chain variable fragment*) – jednołańcuchowy fragment przeciwciała
- SD** (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe
- SDS** (ang. *sodium dodecyl sulfate*) – siarczan dodecyłu sodu
- SDS-PAGE** (ang. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących
- SEM** (ang. *scanning electron microscope*) – skaningowy mikroskop elektronowy
- siRNA** (ang. *silencing RNA*) – wyciszający RNA
- S.O.C.** (ang. *Super Optimal Catabolite repression*) – kompletna, bogata pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
- V** (wolt) – jednostka napięcia
- tab.** – tabela
- TAE** – bufor do elektroforezy DNA
- TfR** (ang. *transferrin receptor*) – receptor transferynowy
- THP** (ang. *tumor homing peptides*) – peptydy rozpoznające nowotwory
- tRNA** (ang. *transfer RNA*) – transportujący RNA
- UV** (ang. *ultraviolet*) – ultrafiolet
- VEGF** (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
- VEGFR** (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego

1. Wstęp

1.1 Choroby nowotworowe piersi

1.1.1 Epidemiologia

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym wśród kobiet. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia w 2008 roku na świecie odnotowano 1380000 zachorowań oraz 458 000 zgonów [1]. Zachorowalność na ten nowotwór uważana jest za niską, gdy współczynnik standaryzowany (ASR) osiąga nie więcej niż 20 przypadków na 100 000 populacji. Taka zachorowalność notowana jest obecnie tylko w krajach Afryki Wschodniej. Najwyższe współczynniki tj. 80-90 przypadków na 100 000 dotyczą Ameryki Północnej, regionów Ameryki Południowej, większości Północnej i Zachodniej Europy oraz Australii [2, 3].

W Polsce w 2012 r. najwyższa zachorowalność na nowotwory złośliwe dotyczyła raka płuca, raka jelita grubego, raka piersi, raka prostaty i raka pęcherza moczowego. Najwięcej zgonów spowodowały nowotwory: płuca, jelita grubego, żołądka, piersi i trzustki. Według oszacowań w 2012 roku zachorowało na nowotwory złośliwe w Polsce 145 890 osób, a zmarło około 98 500. W 2012 roku w Polsce rozpoznano ponad 17 tysięcy nowych przypadków raka piersi. Pomimo ogromnego rozwoju współczesnej medycyny i projektowaniu nowych metod leczenia raka piersi, blisko 6 tysięcy spośród nowych przypadków zachorowań było przyczyną zgonu, przy czym 99% tych przypadków wystąpiło u kobiet. Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym rodzajem nowotworu złośliwego u kobiet, co stanowi 22% wszystkich nowych przypadków raka w populacji żeńskiej, wyprzedzając raka jelita grubego (10%) i raka płuca (9%). Ponadto, rak piersi jest drugą po raku płuca przyczyną umieralności u kobiet chorych na nowotwory, stanowiąc 15% spośród wszystkich zgonów nowotworowych [4]. Zachorowalność w Polsce różni się w poszczególnych województwach, w Wielkopolsce ryzyko zachorowania na raka piersi jest wyższe (tj. 56/100 000 ASR) od średniej dla Polski (tj. 48/100 000 ASR). Wyższe współczynniki rejestrowane są tylko w woj. dolnośląskim [5, 6]. Pomimo coraz większej zachorowalności na raka piersi nie wzrasta umieralność z jego powodu. Zachorowalność na ten nowotwór rośnie zwłaszcza u kobiet w wieku 50-64 lat.

1.1.2 Leczenie nowotworów piersi

Rak piersi nadal stanowi poważne wyzwanie w zakresie optymalnego doboru leczenia. Dotychczas stosowane metody leczenia ogólnoustrojowego chorych na nowotwory piersi są niezadowalające. Jednakże, wcześniej wykryty rak piersi w niskim stopniu zaawansowania jest nie tylko wyleczalny, ale poprzez odpowiedni zabieg operacyjny i skojarzone z nim leczenie daje kobietom możliwość zachowania piersi [7].

1.1.2.1 Pierwotne

Standardową metodą leczenia raka piersi jest chirurgiczne usunięcie zmiany pierwotnej z odpowiednim marginesem chirurgicznym. Leczenie chirurgiczne piersi można podzielić na operacje oszczędzające i amputację (mastektomia). W Polsce, ze względu na zaawansowane stadia raków piersi, dominują zabiegi amputacyjne. Jednak, dzięki coraz powszechniejszym programom profilaktycznym oraz badaniom przesiewowym obserwujemy większą ilość wczesnych rozpoznań, co przyczynia się do zwiększania ilości operacji oszczędzających gruczoł piersiowy [7].

1.1.2.2 Leczenie uzupełniające

1.1.2.2.1 Radioterapia

Decyzję o podjęciu leczenia uzupełniającego, a także o wyborze sposobu leczenia podejmuje się na podstawie wyniku badania histopatologicznego usuniętych tkanek. Na dobór metody leczenia wpływa również rodzaj zastosowanego leczenia chirurgicznego (mastektomia/ leczenie oszczędzające). Radioterapia wykorzystuje promieniowanie jonizujące, które niszczy aktywnie dzielące się komórki raka. Radioterapię uzupełniającą u chorych na raka piersi prowadzi się gdy wykonano zabieg oszczędzający pierś oraz gdy dokonano amputacji piersi, ale występują wskazania do radioterapii pooperacyjnej. Ma to na celu eliminację ewentualnie przetrwałych komórek nowotworowych w okolicy po wyciętym guzie i tym samym zapobiega nawrotowi choroby. Takie leczenie jest bezbolesne, cechuje się niewielkimi objawami ubocznymi, które mogą, ale nie muszą ujawnić się po terapii, najczęściej w postaci zwłóknienia w okolicy rany czy przejściowego zaczerwienienia skóry [2]. Prócz standardowej radioterapii (teleradioterapii), jako metodę leczenia wykorzystuje się radioterapię śródoperacyjną oraz brachyterapię (radioterapię miejscową) [7, 8].

1.1.2.2.2 Leczenie systemowe

Decyzja o zastosowaniu systemowego leczenia uzupełniającego powinna się opierać na ocenie indywidualnego ryzyka nawrotu (określenie rokowania na podstawie znanych czynników rokowniczych) i potencjalnych korzyści związanych z tym leczeniem. Niezbędne

jest uwzględnienie przewidywanych działań niepożądanych leczenia systemowego, stanu sprawności chorego, chorób współistniejących i preferencji chorych. Na leczenie systemowe składają się hormonoterapia i chemioterapia [8].

1.1.2.2.1 Hormonoterapia

Leczenie hormonalne jest istotnym elementem leczenia chorych z rakiem piersi. Kwalifikują się do niego pacjentki u których w badaniu histopatologicznym stwierdzono obecność receptorów steroidowych w tkance guza (receptory estrogenowe i progesteronowe) [8].

1.1.2.2.2 Chemioterapia

Chemioterapia polega na podawaniu leków niszczących komórki nowotworowe. Leki cytostatyczne podawane są w postaci kroplówek, iniekcji dożylnych, domięśniowo lub doustnie. Chemioterapia stosowana jest na różnych etapach leczenia raka piersi. Rozróżniamy: (i) leczenie adjuwantowe (uzupełniające) – stosowane jest u chorych po radykalnych zabiegach operacyjnych, u których z uwagi na obecność niekorzystnych czynników rokowniczych w badaniu histopatologicznym istnieje duże ryzyko rozsiewu choroby nowotworowej, (ii) leczenie neoadjuwantowe – jest to leczenie wstępne stosowane przed radykalnym zabiegiem chirurgicznym, w wielu przypadkach pozwala na operację radykalną, która przed chemioterapią była niemożliwa, oraz (iii) leczenie choroby rozsianej – stosowane u chorych z przerzutami odległymi, które istnieją już w momencie rozpoznania lub gdy do rozsiewu choroby doszło pewien czas po leczeniu radykalnym [2].

1.1.2.2.3 Ograniczenia chemioterapii

W ciągu ostatnich lat osiągnięto znaczący postęp w zrozumieniu podstaw molekularnych wielu chorób nowotworowych [9]. Lepsze spojrzenie na procesy przyczyniające się do transformacji nowotworowej doprowadziło do opracowania kilku nowych klas chemioterapeutyków [10]. Jednakże, właściwości farmakokinetyczne, jak i dystrybucja leku chemioterapeutycznego po podaniu dożylnym często są dalekie od optymalnych. Ze względu na niską masę cząsteczkową, większość rutynowo stosowanych środków przeciwnowotworowych jest szybko usuwana z krążenia ogólnego (np. przez nerki), bez wystarczającej akumulacji w guzie. Ponadto, małe cząsteczki stosowane w rutynowych terapiach oddziałują nie tylko na komórki nowotworowe. Ze względu na ich małe rozmiary i wysoką hydrofobowość, molekuly leku mają tendencję do gromadzenia się i powodowania toksyczności w tkankach zdrowych. Tym samym, leki przeciwnowotworowe w dawkach terapeutycznych podawane ogólnoustrojowo mogą powodować wczesne lub późne poważne

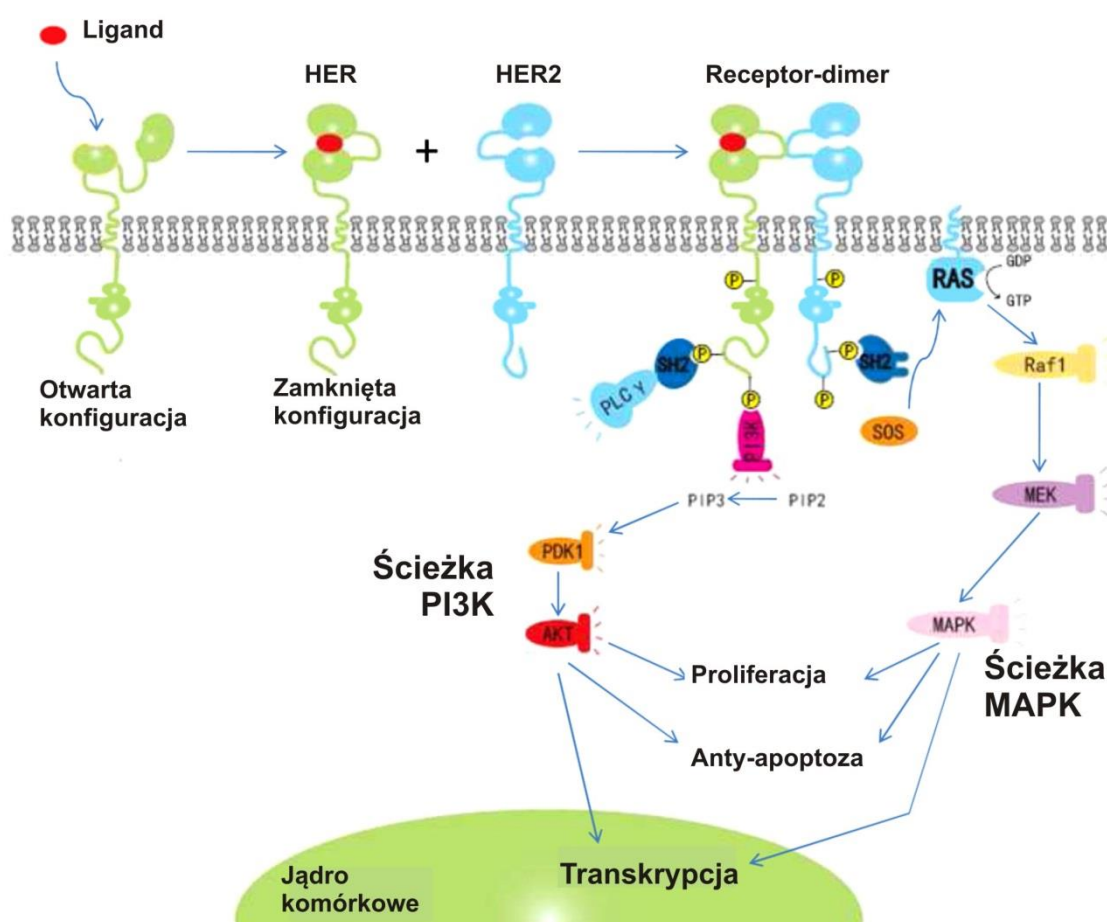
działania niepożądane. Zatem równowaga pomiędzy korzyścią terapeutyczną a toksycznością często jest nie do zaakceptowania dla pacjentów. Ponadto, leki przeciwnowotworowe napotykać na wiele przeszkód koniecznych do pokonania przed wywołaniem efektu przeciwnowotworowego, np. związane z degradacją enzymatyczną i degradacją w wątrobie, z wysokim ciśnieniem płynu śródmiąższowego typowym dla guzów [11], czy też z obecnością błon komórkowych i jądrowych [12, 13]. Na podobne problemy natrafiają także różne terapeutyczne czynniki biologiczne, takie jak kwasy nukleinowe, stosowane na przykład w terapii genowej, które ulegają degradacji w obiegu przez co nie są kierowane do odpowiednich komórek docelowych *in vivo*. W celu poprawy właściwości farmakokinetycznych i zwiększenia akumulacji w miejscu docelowym, prowadzone są obecnie intensywne badania w dziedzinie dostarczania środków toksycznych bezpośrednio do komórek nowotworowych, oszczędzając inne komórki ciała (głównie komórki dzielące się, takie jak komórki szpiku kostnego). Kapsułkowanie i kierowanie toksycznego leku bezpośrednio do nowotworu byłoby bardzo korzystne.

1.1.3 Nowotwory Her2-pozytywne

Jeden z proponowanych mechanizmów nabywania wewnętrznej odporności na leczenie nowotworów dotyczy rodziny receptorów ludzkiego czynnika wzrostu naskórka (HER, ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor). W szczególności członek rodziny receptorów, Her2, prezentowany w licznych nowotworach [14-17], istotnie wpływa na skuteczność leczenia. Spośród raków piersi 20-30% charakteryzuje się amplifikacją genu i/lub wzmożoną ekspresją receptora Her2. Wykazano, że nadekspresja receptora Her2 związana jest z bardziej agresywnym przebiegiem choroby, zwiększonym stopniem złośliwości histologicznej, a także krótszym czasem całkowitego przeżycia pacjentów [18-21].

Receptor Her2, znany również jako ErbB2, c-erbB2 lub HER2/neu jest białkiem o masie cząsteczkowej 185 kDa (p185) z wewnątrzkomórkową domeną kinazy tyrozynowej, domeną transmembranową i zewnątrzkomórkową domeną wiążącą ligand. Rodzina ludzkich receptorów HER składa się z czterech strukturalnie spokrewnionych typów, Her1 (ErbB1, znany również jako EGFR), Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) oraz Her4 (ErbB4). Pomimo, że Her2 jest jedynym spośród rodziny receptorów, dla którego nie zidentyfikowano specyficznego ligandu, jest preferowanym partnerem dla pozostałych typów do tworzenia heterodimeru. Her2 zaangażowany w heterodimeryzację wykazuje największą aktywność w szlaku transdukcji sygnału spośród wszystkich receptorów rodziny HER [17, 22]. Her2 odgrywa ważną rolę we wzroście, różnicowaniu i cyklu komórkowym. Głównymi szlakami

sygnalizacyjnymi, w które zaangażowany jest Her2 są szlaki MAPK, PI3K i PLC γ . Her2 jest jednym z głównych genów przeżycia komórek, przez co jego amplifikacja i nadekspresja białka prowadzi do złośliwej transformacji [23-26] (Ryc. 1). To bezpośrednio wiąże się ze słabymi prognozami leczenia nowotworów Her2-dodatnich [22, 27].



Ryc. 1 Szlak sygnałowy receptora Her2. Ligand wiąże się z receptorem HER i następuje aktywacja receptora. Następnie Her2 dimeryzuje z aktywowanym receptorem HER, co prowadzi do fosforylacji reszt tyrozynowych i transdukcji sygnału. PLC γ , PI3K i MAPK są najczęstszymi kaskadami sygnalizacyjnymi, natomiast PI3K i MAPK są głównymi szlakami zaangażowanymi w transformację nowotworową. Źródło: [21] (zmienione)

W normalnych komórkach Her2 odgrywa ważną rolę we wszystkich stadiach rozwoju komórki. Jednakże mutacja lub nadekspresja Her2 może bezpośrednio prowadzić do tworzenia się guzów, jak również przerzutowania. U gryzoni, do tumorogenezy wymagana jest mutacja genu *neu* (gen gryzoni *HER2*), natomiast ludzki Her2 wydaje się posiadać potencjał nowotworzenia poprzez amplifikację genu *HER2* typu dzikiego [21]. Nadekspresja

Her2 wzmacnia i wydłuża sygnały, które powodują transformację komórek. W ludzkich nowotworach Her2 ulega nadekspresji najczęściej w przypadku raka piersi, raka żołądka, raka jajnika i raka prostaty [17, 28, 29].

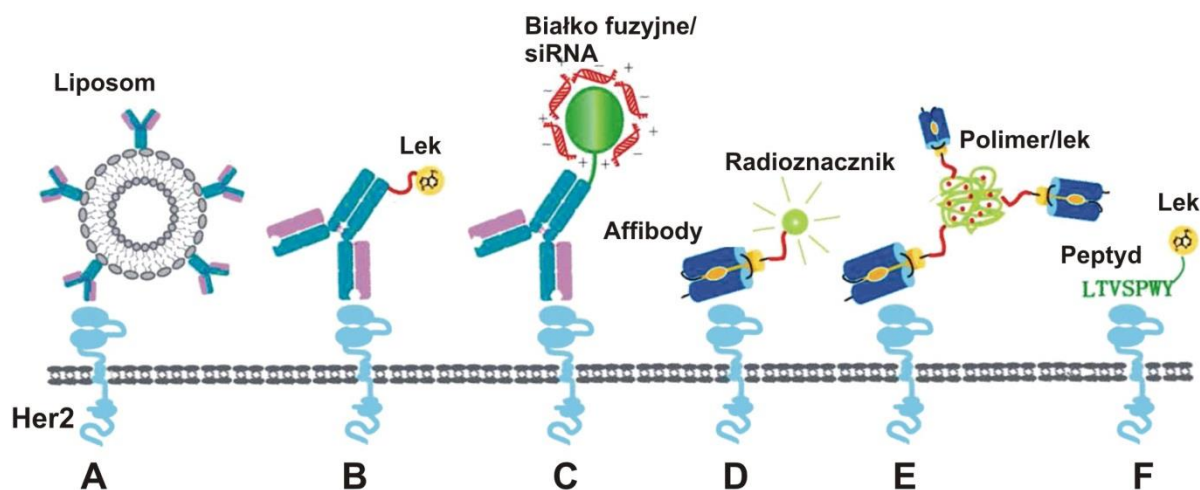
Nadekspresja Her2 zwykle powoduje złośliwą transformację komórek i stanowi 20-30% wszystkich przypadków raka piersi. Jest zawsze związana z bardziej agresywnym fenotypem nowotworowym, większym prawdopodobieństwem przerzutów i zwiększoną odpornością na hormonoterapię [28]. Ogólny wskaźnik przeżycia i czas do nawrotu Her2-dodatnich raków piersi jest znacznie krótszy niż u chorych na nowotwory bez nadekspresji receptora Her2. Wykazano wartość zarówno prognostyczną, jak i terapeutyczną receptora Her2 w raku piersi [30]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że hamowanie receptora Her2 indukuje znaczącą apoptozę w komórkach raka piersi [31]. Ponadto, wykazano w badaniach *in vitro*, że zmniejszenie ekspresji Her2 poprzez specyficzne siRNA powodowało zahamowanie wzrostu i apoptozę Her2-pozytywnych komórek raka piersi. Wszystkie te dane wskazują na istotną rolę Her2 w proliferacji i działaniu przeciwapoptotycznym w Her2-dodatnich nowotworach piersi. Dlatego też, Her2 wydaje się być logicznym celem dla leczenia nowotworów piersi.

1.1.4 Leczenie nowotworów Her2-pozytywnych

Od początku odkrycia roli receptora Her2 w nowotworzeniu stał się on istotnym celem molekularnym w terapii nowotworów. Istnieją liczne powody, dla których Her2 jest ważnym celem terapeutycznym w leczeniu raka: (i) znacznie wyższy poziom ekspresji Her2 w komórkach nowotworowych w stosunku do komórek prawidłowych, (ii) nadekspresja Her2 zarówno w nowotworach pierwotnych jak i przerzutach do narządów [32], (iii) Her2 jest preferowanym partnerem dimeryzacji dla innych receptorów w aktywacji szlaków sygnałowych, (iv) Her2 posiada najbardziej mitogenny potencjał spośród kompleksów, (v) hamowanie dimeryzacji Her2 zapobiega aktywacji różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych w tym PI3K i MAPK [33-35] – ponieważ poszczególne domeny Her2 są odpowiedzialne za inny aspekt szlaku sygnałowego, każda z nich może oddzielnie być wykorzystana do blokowania sygnalizacji za pośrednictwem receptora Her2, (vi) można uzyskać bezpośrednią inhibicję Her2 poprzez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów lub siRNA.

Monoklonalne przeciwciało humanizowane skierowane przeciwko Her2 (trastuzumab, Herceptin TM) zostało zatwierdzone przez FDA w 1998 roku do leczenia Her2-dodatnich

nowotworów piersi [36]. Od tego czasu, wiele swoistych przeciwciał anti-Her2 i drobnocząsteczkowych inhibitorów molekularnych oceniano w badaniach klinicznych [37, 38]. Obecnie największy nacisk jest kładziony na projektowanie systemów celowanego dostarczania leków za pomocą sztucznych ligandów dla Her2, w tym przeciwciał, fragmentów Fab [39], scFv [40], cząsteczek affibody [41] i peptydów [42] (Ryc. 2).



Ryc. 2 Wybrane strategie ukierunkowanego dostarczania leków do komórek Her2-dodatnich. (A) Liposom sprzężony z przeciwciałem anti-Her2; (B) Kompleks przeciwciało anti-Her2 – lek (ADC); (C) Białko fuzyjne przeciwciała anti-Her2 z białkiem wiążącym kwas nukleinowy; (D) Izotop promieniotwórczy sprzężony z cząsteczką anti-Her2 affibody do obrazowania guzów; (E) Polimerowy system dostarczania leku sprzężony z cząsteczką affibody; (F) Koniugat peptyd anti-Her2/lek. Źródło: [21] (zmienione)

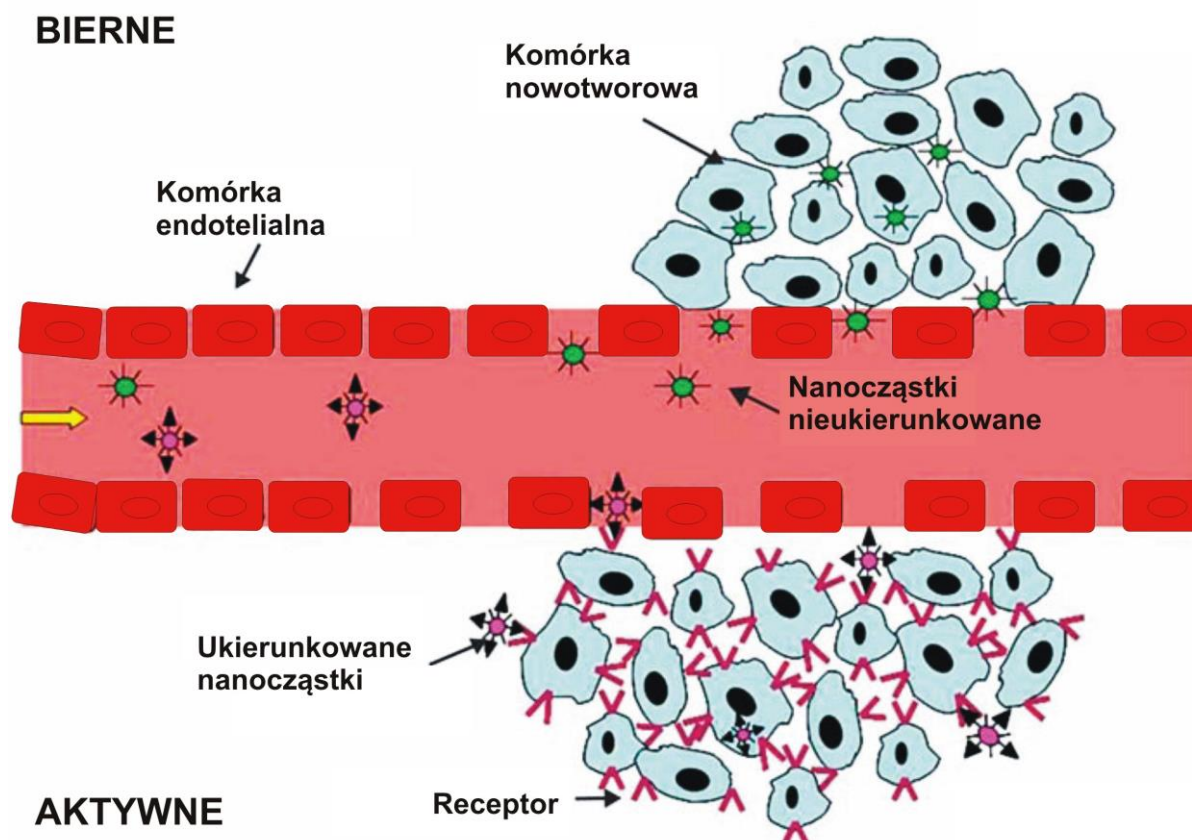
Taki nanosystem może być stosowany do dostarczania drobnocząsteczkowych leków, jak i kwasów nukleinowych. Znane są przykłady zastosowania liposomów stabilizowanych PEG, sprzężonych z fragmentem scFv przeciwciała anti-Her2, wykazujących długotrwałą cyrkulację i selektywne dostarczanie inkorporowanego leku, dokсорubicyny [40, 43]. Wykazano również swoiste dostarczanie paklitakselu do przerzutowego raka prostaty przy wykorzystaniu kationowych liposomów anti-Her2 [44]. Znane są również doniesienia pokazujące selektywne dostarczenie kwasów nukleinowych do komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję Her2, co osiągnięto poprzez sprzężenie fragmentów Fab przeciwciał anti-Her2 z kompleksami liposom/DNA [45].

Her2-ukierunkowane systemy dostarczania leków znacznie zwiększają indeks terapeutyczny poprzez wzmacnianie skuteczności przeciwnowotworowej i zmniejszenie toksyczności ogólnoustrojowej.

1.2 Nanosystemy dostarczania leków w terapii nowotworów

Zastosowanie nanotechnologii w medycynie oferuje nowe możliwości i perspektywy dla innowacyjnych i skutecznych metod leczenia schorzeń nowotworowych. Dużą popularnością cieszy się nanomedycyna, którą można zdefiniować jako projektowanie i wytwarzanie nośników środków terapeutycznych i/lub środków diagnostycznych w nanoskali (o średnicy w zakresie od 1 nm do 1000 nm) [46]. Takie nanocząstki posiadają możliwość transportowania i dostarczania różnych czynników biologicznych stosowanych w leczeniu, zapobieganiu i diagnostyce wielu chorób [47-52].

Różne koncepcje dostarczania leków do nowotworów były badane i rozwijane na przestrzeni lat, w tym bierne dostarczanie, aktywne dostarczanie do komórek nowotworowych, aktywne kierowanie do komórek śródbłonna czy też stymulowane dostarczanie leku (z zastosowaniem reagującego na bodźce materiału nośnikowego) [10, 53-62]. Ryc. 3. przedstawia dwie główne strategie, które są obecnie wykorzystywane do kontrolowanego dostarczania leku do guza, a mianowicie bierne lub aktywne dostarczanie leków [46, 63].



Ryc. 3 Schematyczny diagram przedstawiający akumulację nanocząstek w miejscu nowotworu w oparciu o bierne i aktywne kierowanie. Źródło: [64] (zmienione)

1.2.1 Bierne dostarczanie leków

1.2.1.1 Efekt EPR

Komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na tlen i substancje odżywcze w miarę zwiększenia objętości guza. W celu zaopatrzenia w składniki odżywcze i tlen, intensywnie rozwijany jest nowy system naczyń krwionośnych, które nie są właściwie wykształcone [65]. Te patologiczne naczynia są przepuszczalne dla cząsteczek o określonej wielkości [66]. Ogromna większość nanocząstek zaprojektowanych do dostarczania leku w miejsce guza angażuje efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR, ang. enhanced permeability and retention effect) [67-69]. Efekt EPR został opisany niemal trzydzieści lat temu. Maeda i wsp. (1986) wykazali, że barwnik błękitu Evansa, który wiąże się z albuminą osocza, po podaniu dożylnym koncentruje się selektywnie w tkankach nowotworowych. To samo zachowanie zaobserwowano dla białek osocza wyznakowanych radioznacznikami, w tym transferyny (90 kDa) i IgG (160 kDa), natomiast białka o mniejszym ciężarze

cząsteczkowym, takie jak neokarcynostatyna (12 kDa) i owomukoid (29 kDa) nie gromadziły się w tkance nowotworowej [69].

Właśnie ze względu na nieszczelny układ naczyniowy guzów w porównaniu ze zdrowymi naczyniami normalnych organów, nanonośniki mogą ulegać akumulacji w miejscu guza [70, 71]. Cząstki o wymiarach nanometrycznych w przypadku podawania dożylnego mają tendencję do dłuższej cyrkulacji, jeśli nie są one na tyle małe, aby być wydalone przez nerki lub na tyle duże, aby być szybko rozpoznane i dezaktywowane przez układ retikuloendotelialny (RES, ang. reticuloendothelial system) [72, 73]. Aby wydłużyć czas cyrkulacji i osiągnąć większą wydajność kierowania, wielkość cząstek powinna wynosić poniżej 100 nanometrów, a ich powierzchnia powinna mieć hydrofilowy charakter w celu obejścia systemu makrofagów [74, 75]. W związku z tym, nanocząstki o długim czasie krążenia we krwi przechodzą preferencyjnie do tkanki nowotworowej przez nieszczelny układ unaczynienia guza i następnie są zatrzymywane w guzie z powodu ograniczonego drenażu limfatycznego [70]. Bierne dostarczanie jest więc oparte na mechanizmie hemodynamicznej równowagi sił w układzie naczyniowym oraz mechanizmie dyfuzji. Zatem, większość nanonośników gromadzi się wewnątrz nowotworów ze względu na efekt EPR, a następnie uwalnia swój terapeutyczny ładunek. Jednakże należy pamiętać, że efekt EPR zapewnia stosunkowo niską swoistość, oferuje 20-30% wzrost dostarczania do tkanek nowotworowych w porównaniu z organami normalnymi. Nanowymiarowe nośniki leków przeciwnowotworowych wykazały skuteczność w dostarczaniu w zwierzęcych modelach raka, a wiele z nich testowano w badaniach klinicznych [76]. Jednak stopień odpowiedzi był różny, co prawdopodobnie było związane z szeroką różnorodnością efektów EPR obserwowanych wśród różnych typów nowotworów, a nawet w poszczególnych nowotworach [73]. Złożony efekt EPR jest zależny od wielu czynników [10, 13, 77], takich jak: (i) stopień angiogenezy i limfangiogenezy, (ii) stopień wzrostu i gęstość tkanki okołonaczyniowej guza przylegającej do naczyń krwionośnych, oraz (iii) ciśnienie wewnątrz guza. Poprzez wybiórcze oddziaływanie na te elementy, zjawisko EPR można wzmocnić, co prowadzi do zwiększonego ostatecznego dostarczania leku, a przez to zwiększa ich działanie przeciwnowotworowe [78, 79].

1.2.2 Czynne dostarczanie leków

Bierne strategie dostarczania wykazały wiele ograniczeń, dlatego obecnie trwają intensywne badania dotyczące aktywnych strategii dostarczania leków w nanocząstkach [10, 54, 63, 80, 81]. Aktywne kierowanie nanonośników obejmuje stosowanie różnych ligandów

powinowactwa bezpośrednio wiążących nanocząstki do różnych celów biologicznych, które ulegają niskiej ekspresji w błonie komórek zdrowych, natomiast nadekspresji w chorej tkance [60, 82, 83]. Takie podejście może być wykorzystane dla uzyskania kontrolowanego uwalniania leku. Lek może być uwalniany selektywnie pozakomórkowo lub wewnątrzkomórkowo. W przypadku związania nanocząstek z receptorem dochodzi do internalizacji w wyniku endocytozy za pośrednictwem receptora, w rezultacie czego nanonośniki trafiają do endosomów i ostatecznie do lizosomów [55, 84]. Dystrybucja czynników terapeutycznych jest ściśle związana z ich właściwościami koloidalnymi, podczas gdy ligand kierujący pełni kluczową rolę w zwiększeniu zarówno rozpoznawania komórek jak i wychwytu komórkowego w miejscach docelowych [10, 57, 58]. Jak opisano powyżej, aktywne dostarczanie czynników terapeutycznych polega na wiązaniu do docelowych komórek nowotworowych, a następnie przenikanie do komórek i wewnątrzkomórkowe uwalnianie substancji czynnej. Nośniki leków są funkcjonalizowane ligandami swoistymi dla receptorów docelowych komórek nowotworowych i cząsteczek błonowych swoistych dla nowotworu. Podejście aktywnego dostarczania jest oparte na swoistych oddziaływaniach, takich jak węglowodany – lektyna, ligand – receptor oraz przeciwciało – antygen [85].

1.2.2.1 Ligandy

Różne rodzaje ukierunkowanych ligandów zostały wykorzystane do projektowania funkcjonalizowanych nanonośników [73, 77, 86, 87]. Rozpoznawany receptor może być charakterystyczny dla nowotworu lub tkanki, w której rozwija się nowotwór. Receptory dla nowotworu obejmują również te ulegające nadekspresji w powiązonym z nowotworem układzie naczyniowym. Jednakże, nie można wyróżnić unikalnych receptorów prezentowanych tylko w nowotworach, a nieobecnych w komórkach prawidłowych. Dlatego często stosowanymi są ligandy swoiste tkankowo lub ligandy ulegające nadekspresji na komórkach nowotworowych, co zwykle powoduje zmniejszenie skutków ubocznych wywieranych na normalne tkanki. Przykładowo, pochodne galaktozy, które rozpoznają receptor asialoglikoproteinowy (ASGPR) (ulegający ekspresji w hepatocytach i komórkach raka wątrobowokomórkowego) [88], oraz rytuksymab, który wiąże CD20 (ulegający ekspresji w prawidłowych i nowotworowych komórkach B) [82] okazały się użyteczne do celowanej terapii nowotworów.

Inne ważne aspekty w doborze optymalnego ligandu oprócz poziomu ekspresji odpowiadającego receptora w guzie obejmują: zdolność do internalizacji i szybkość wiązania receptora, powinowactwo do receptora, rozmiar ligandu, immunogenność, jak również

dostępność. Nanonośniki funkcjonalizowane cząsteczką ulegającą internalizacji wykazują lepszą efektywność dostarczania niż te z molekułą nieinternalizującą. Jednakże, w niektórych przypadkach, cząsteczka nie ulegająca internalizacji, która wiąże się tylko na powierzchni komórki może mieć przewagę ze względu na indukowanie odpowiedzi immunologicznej, takiej jak zależna od przeciwciał cytotoksyczność komórkowa (ADCC, ang. antibody-dependent cellular cytotoxicity) [89].

Znanymi przykładami o potencjale kierującym są kwas foliowy, transferyny, peptydy czy przeciwciała. Receptor kwasu foliowego (FR, ang. folate receptor) ulega nadekspresji w wielu ludzkich nowotworach, takich jak rak jelita grubego, rak jajnika i rak piersi, a nie jest prezentowany w większości normalnych tkanek. Zatem, FR jest wysoce selektywnym markerem nowotworowym. Opisano między innymi przyłączenie kwasu foliowego do liposomów [90-95]. Kwas foliowy ma zalety prostej chemicznej koniugacji do leku oraz brak immunogenności. Innym przykładem jest wykorzystanie znaczącego wzrostu poziomu ekspresji receptora transferyny (TfR) w komórkach nowotworowych, który obserwuje się ze względu na ich wyższe zapotrzebowanie na żelazo [96-98]. Dostarczanie za pośrednictwem TfR może zostać osiągnięte poprzez chemiczną koniugację transferyny, przeciwciała anti-TfR lub fragmentów przeciwciał do nanocząstek. Ze względu na wysoką swoistość i powinowactwo oddziaływań przeciwciała – antygen, dostarczanie za pośrednictwem przeciwciał oraz fragmentów przeciwciał, takich jak Fab i scFv jest atrakcyjnym środkiem do funkcjonalizowania nanocząstek. Potencjalne problemy to immunogenność, wysokie koszty i duży rozmiar ligandu [82]. Jako alternatywa dla przeciwciał, dużą popularność jako ligandy kierujące zyskały peptydy, z powodu ich małych rozmiarów, niższej immunogenności i wyższej stabilności oraz łatwego wytwarzania [99, 100]. Przykładowo, cykliczny wariant peptydu arginina – glicyna – kwas asparaginowy (RGD) swoisty dla receptora integryny $\alpha_v\beta_3$ jest stosowany jako ligand kierujący do naczyń guza [101]. Można wymienić szereg innych przykładów receptorów dla ligandów o potencjalnym zastosowaniu w terapii celowanej nowotworów, jak receptory hormonalne, receptory mannozy, lipoproteinowe, makroglobulinowe, naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR oraz Her2), czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGFR), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR) oraz receptory insulinowe [102-105].

Wiele celów molekularnych związanych jest z określonymi przedziałami subkomórkowymi [106, 107]. Transportowanie środków terapeutycznych do poszczególnych organelli jest atrakcyjną strategią dostarczania leków. Nanonośniki mogą być zaprojektowane

tak, by skutecznie kierować do organelli wewnątrzkomórkowych, w tym wczesnych i późnych endosomów, lizosomów, cytoplazmy, jądra i mitochondriów. Sekwestracja nanonośników leków wewnątrz endosomów lub lizosomów w procesie endocytozy jest jednym z najbardziej krytycznych momentów cytoplazmatycznego dostarczania leków, zwłaszcza leków o wysokiej masie cząsteczkowej (takich jak np. plazmidowe DNA i siRNA). Zaprojektowano strategie mające na celu zwiększenie ucieczki z endosomów/lizosomów w wyniku kontrolowanej destabilizacji błon (np. wywołanej przez kwaśne pH środowiska, środowisko redukcyjne lub proteazy). Można to osiągnąć, przez wprowadzenie fuzogennego peptydu [108]. Alternatywnie nanonośniki mogą być zaprojektowane tak, aby pominąć ścieżkę endosomalną. Strategia ta zakłada przyłączenie do nanocząstek peptydów penetrujących komórkę (CPP, ang. cell penetrating peptides), które przenikają błony komórkowe i wnikają do wnętrza komórek [100, 109-111]. W celu kierowania leku do mitochondriów i jądra, konieczne jest przyłączenie odpowiednich sekwencji sygnałowych, np. sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. nuclear localization signal) [112] lub peptydu sygnałowego kierującego do mitochondrium (MTS, ang. mitochondrial targeting signal) [107].

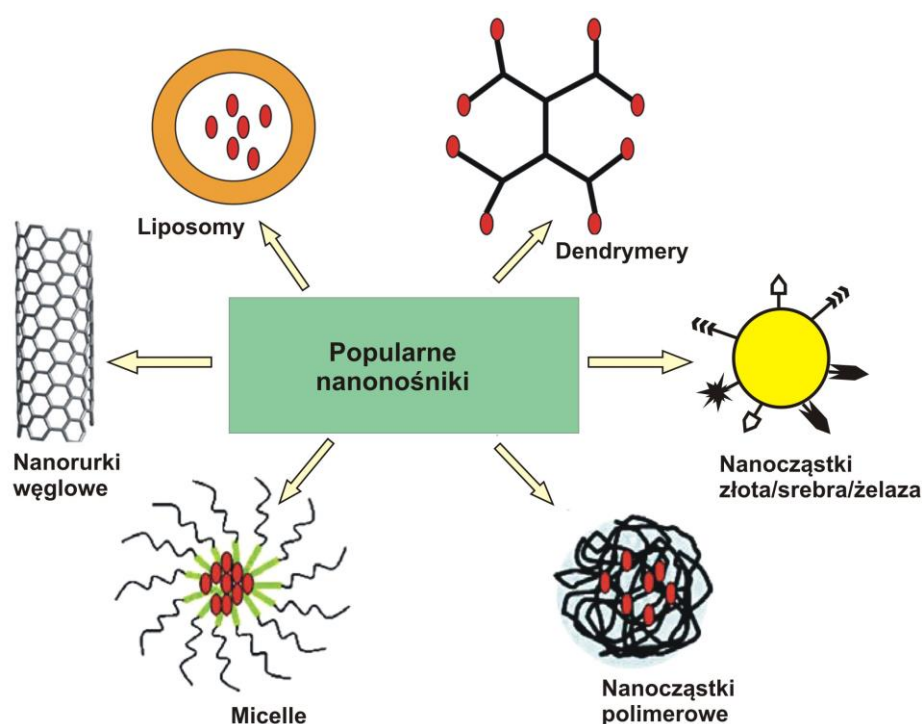
1.2.2.2 Strategia czynnego dostarczania leku

Istnieje kilka przyczyn, dlaczego aktywnie kierowane liposomy, micelle czy polimerowe nanocząstki do tej pory nie zostały zatwierdzone do stosowania klinicznego, a jedynie niewiele jest w trakcie badań klinicznych. Zaobserwowano, że w obrębie guza, po opuszczeniu nieszczelnego układu naczyniowego, nośniki napotykają na liczne anatomiczne i fizjologiczne przeszkody, które należy pokonać, zanim nanocząstki sprzężone z przeciwciałami lub peptydami zwiążą się (i wejdą) do komórek nowotworowych. Te przeszkody obejmują obecność komórek pericytów, mięśni gładkich i warstwy komórek fibroblastów pomiędzy komórkami śródbłonna i komórkami nowotworowymi, dużą gęstość komórek w obrębie guzów litych oraz wysokie ciśnienie płynu śródmiąższowego, które jest typowe dla nowotworów [11, 73]. Drugim rodzajem przeszkody jest zjawisko zwane barierą miejsca wiązania [113], opisujące wiązanie cząsteczek z antygenami w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych, co w istotny sposób ogranicza penetrację aktywnie dostarczanych nanocząstek do tkanki śródmiąższowej guza. Dlatego nanocząstki mogą mieć problemy ze znalezieniem komórek docelowych, a przez to nie wykazywać przewagi nad dostarczaniem biernie nanosystemami. Aby przezwyciężyć niektóre z wyżej wymienionych przeszkód w odniesieniu do aktywnego kierowania nanonośników, rozwijana jest strategia

kierowania nanocząstek z czynnikiem terapeutycznym do komórek śródbłonna naczyń [114-116]. Ponadto, oczekuje się, że coraz więcej uwagi w najbliższych latach zyskają systemy oparte na stymulowanym uwalnianiu leków [10]. Strategia ta polega na uwolnieniu zawartości cząstek transportujących po zadziałaniu bodźców zewnętrznych, takich jak ciepło, światło, ultradźwięki, pole magnetyczne. Reagujące na bodźce nanocząstki, takie jak Thermodox (tj. liposomalny preparat doksorubicyny wrażliwy na temperaturę), posiadają istotny potencjał kliniczny, ponieważ są one przeznaczone tylko do uwolnienia uwięzionego lub sprzężonego chemioterapeutyku lokalnie po dostarczeniu do odpowiedniego kompartmentu ciała i zadziałaniu bodźca [103, 117].

1.2.3 Rodzaje nanocząstek do dostarczania leków

Opracowano kilka klas nanonośników zdolnych do transportowania leków, do których należą między innymi nanocząstki lipidowe (liposomy), nanocząstki metaliczne, nanocząstki białkowe, dendrymery, biokompatybilne polimery (np. nanocząstki polimerowe), środki powierzchniowo czynne (micele), węglowe nanorurki czy nanopręty [46, 81, 118-120] (Ryc. 4). Leki mogą być transportowane w pęcherzykach, związane w matrycy, a także rozpuszczone w hydrofilowym lub hydrofobowym rdzeniu [64].



Ryc. 4 Powszechnie stosowane nanocząstki.

Liposomy są samoorganizującymi się pęcherzykami składającymi się z podwójnej warstwy lipidowej otaczającej wewnętrzną rdzeń wodny. Hydrofilowe leki są łatwo wprowadzane do wodnego rdzenia, podczas gdy lipofilowe leki rozpuszczają się w podwójnej warstwie lipidowej [121-123]. Liposomy transportujące leki chemioterapeutyczne takie jak doksorubicyna (Doxil[®]) i daunorubicyną (DaunoXome[®]) zostały zatwierdzone przez FDA w połowie lat 90-tych [77]. Doxil, liposomalny preparat zbudowany z cholesterolu i fosfolipidu – uwodnionej fosfatydylocholinej sojowej (HSPC) o wysokiej temperaturze przejścia fazowego daje stabilny system dostarczania leków, o zwiększonej zgodności biologicznej, skuteczności i o zmniejszonej ilości efektów cytotoksycznych [124]. Micele są zbudowane ze środków powierzchniowo czynnych, takich jak amfifilowe kopolimery blokowe samoorganizujące się w nanoagregaty (5-100 nm). Hydrofobowe i hydrofilowe polimery blokowe tworzące micidele agregują w wodnym środowisku z wytworzeniem rdzenia hydrofobowego, stabilizowanego przez hydrofilową powłokę. Obserwuje się różne struktury organizacyjne miceli: kopolimery dwublokowe (typu A-B), kopolimery triblokowe (typu A-B-C) i polimery mieszane. Leiki mogą być uwięzione w rdzeniu miceli [50, 123, 125]. W badaniach klinicznych testowano NK911, micidele kopolimeru blokowego glikol polietylenowy-kwas asparaginowy, sprzężonego z doksorubicyną [125]. Dendrymery są dobrze zdefiniowanymi rozgałęzionymi makrocząstkami o wysokiej jednorodności cząsteczkowej i wąskiej polidispersyjności. Hydrofobowe leki mogą być uwięzione w hydrofobowym wnętrzu dendrymerów. Leiki mogą być również związane kowalencyjnie na powierzchni dendrymeru [126]. Gupta i wsp. syntetyzowali cząstki oparte na iminie polipropylenu (PPI) skoniugowane z doksorubicyną, a także z kwasem foliowym. Sprzężone ligandy Dox-PPI-FA wykazywały mniejszą aktywność hemolityczną, były bardziej stabilne i mniej toksyczne [127]. W przypadku nanocząsteczek polimerowych, lek jest przyłączony kowalencyjnie lub fizycznie uwięziony w matrycy polimerowej w zależności od sposobu przygotowania nanocząsteczek. Polimery można podzielić na dwie grupy: polimery naturalne i syntetyczne. Polimery, takie jak chitosan, albumina i heparyna występują naturalnie i są dobrym materiałem do dostarczania DNA, białek, oligonukleotydów oraz leków. Gradishar i wsp. sformułowali nanocząstki stanowiące koniugat paklitakselu z albuminą surowicy. Ten polimer sprzężony z lekiem był testowany w badaniach klinicznych przerzutowego raka piersi. Wykazano większą skuteczność i korzystny profil bezpieczeństwa w porównaniu ze standardowym paklitakselem wśród leczonych pacjentów [128]. Spośród syntetycznych polimerów wymienić można: kopolimer N-(2-hydroksypropylo)-metakrylamidu (HPMA), kwas poli-l-glutaminowy (PGA) czy glikol polietylenowy (PEG) [55]. Polikaprolakton i

policyjanoakrylan są szeroko stosowanymi polimerami w syntezie nanocząstek. PGA jest pierwszym biodegradowalnym polimerem stosowanym do syntez koniugacyjnych z lekiem. HPMC i PEG są najczęściej stosowanymi biokompatybilnymi polimerami syntetycznymi, jednak nie ulegają one biodegradacji, co ogranicza ich zastosowanie [129].

Nowe perspektywy wykorzystania innowacyjnych nanomateriałów w leczeniu nowotworów oferują również nanocząstki złota, z możliwością łączenia obrazowania i terapii [118, 130]. Większość badań dotyczących terapii nowotworów z zastosowaniem nanocząstek złota wykorzystywało podejście fototermiczne, tj. niszczenie komórek nowotworowych lub tkanki nowotworowej poprzez działanie laserem bliskiej podczerwieni. Wykazano ogromny potencjał kliniczny powyższej strategii [131]. Laserowo naświetlone nanocząstki złota mogą działać jako środki lecznicze same w sobie, bez konieczności jednoczesnego sprzęgania leków. Ponadto modyfikowane lekiem nanocząstki złota są testowane w badaniach dostarczania leków, takich jak: badanie uwalniania hydrofobowych cząsteczek leku za pośrednictwem zjawiska dyfuzji, inkorporacja związków terapeutycznych przez kompleksowanie powierzchniowe, kotwiczenie leków bezpośrednio do powierzchni cząstek, ładowanie substancji aktywnych poprzez ich depozycję warstwa po warstwie oraz ładowanie leków wewnątrz nanocząstek [46, 130]. Wśród najczęściej badanych nanosystemów dostarczania znajdują się również węglowe nanorurki, czyli formy alotropowe węgla o cylindrycznej strukturze [61, 119]. Nanorurki węglowe są bardziej dynamiczne w porównaniu z innymi nanomateriałami, przez co mają wiele potencjalnych zastosowań biomedycznych. Ich unikalne właściwości biologiczne i chemiczne, struktura monolityczna, nanocylindryczny kształt i zdolność do przyłączania dowolnej grupy funkcyjnej powodują, że mogą być stosowane jako układy dostarczania leku. Węglowe nanorurki mogą ulegać pasywnej dyfuzji przez dwuwarstwę lipidową lub mogą przyłączyć się do powierzchni komórki, a następnie wniknąć do komórek w wyniku endocytozy [132].

1.2.4 Zalety i ograniczenia stosowania nanocząstek

Nanocząstki mają szereg zalet w porównaniu z nowatorskimi lekami o niskiej masie cząsteczkowej [46]. Charakteryzują się one dużą powierzchnią właściwą, dużą pojemnością ładowania, zdolnością do ochrony przed degradacją dostarczanej substancji aktywnej (w szczególności istotne w przypadku dostarczania czynników biologicznych takich jak kwasy nukleinowe), możliwością swobodnego kierowania, a także zdolnością kontrolowanego i/lub przedłużonego uwalniania [62, 133]. Cechy te mogą być dodatkowo wzmocnione przez zmianę właściwości fizykochemicznych, takich jak rozmiar czy charakter powierzchniowy

nośników [134, 135]. Jedną z najistotniejszych zalet jest zmiana niekorzystnych właściwości fizykochemicznych bioaktywnych molekuł i leków poprzez modyfikację profilu farmakokinetycznego transportowanej substancji aktywnej [136]. Zmiana biodystrybucji transportowanego leku powoduje istotne zmniejszenie cytotoksyczności środków chemioterapeutycznych i znacznie niweluje obserwowane w przypadku konwencjonalnej terapii działania niepożądane. Dzięki zwiększonej biokompatybilności, efektywności dostarczania i ograniczeniu ogólnoustrojowej toksyczności, potencjalnie możliwe jest stosowanie wyższych dawek terapeutycznych [119, 124]. Ponadto, nanonośniki posiadają wydłużony czas cyrkulacji w krwioobiegu, co umożliwia zwiększoną akumulację nanonośnika w miejscu docelowym, a tym samym poprawę dostarczania czynników terapeutycznych [137]. Dodatkowo, kontrolowane uwalnianie środków bioaktywnych oraz selektywne dostarczanie leków do celów biologicznych zapewnia zwiększenie skuteczności terapeutycznej [119]. Należy również wspomnieć o potencjalnych korzyściach teranostycznych, poprzez łączenie funkcji terapii i obrazowania [134, 138].

Nanometryczne systemy dostarczania nie są jednak pozbawione ograniczeń. Największy problem stanowi toksyczność wielu spośród badanych nanosystemów [139]. Nanocząstki są wysoce reaktywne, łatwo ulegają dyspersji i penetrują struktury komórkowe. Zaobserwowano szkodliwy wpływ nanocząstek w układach biologicznych. Konwencjonalne metody fizyczne i chemiczne syntezy nanocząstek metalicznych i polimerowych mogą być jednym z możliwych powodów ich toksyczności [140]. Zatem należy udoskonalić metody syntezy cząstek do zastosowań biomedycznych, tak by uzyskać lepszą biokompatybilność i możliwie niską toksycznością. Ten problem można wyeliminować poprzez wykorzystanie nanocząstek ze źródeł biologicznych.

Mimo, że te nanomateriały mogą zapewniać wysoki stopień zgodności biologicznej, ich wykorzystanie w dziedzinie biomedycyny wymaga kontrolowanych interakcji z makrocząstkami biologicznymi. Aby z powodzeniem stosować nanocząstki w praktyce klinicznej, należy pamiętać o kilku kwestiach, w tym: (i) zapewnieniu korzystnej biodystrybucji i korzystnego okresu półtrwania w krwioobiegu z minimalnym rozpoznawaniem i eliminacją przez układ siateczkowy, (ii) wywoływaniu wysoce terapeutycznego efektu selektywnego (z możliwie minimalnymi działaniami niespecyficznymi), (iii) skutecznym usuwaniu nanocząstek z organizmu człowieka, a przede wszystkim (iv) minimalnym lub całkowicie nietoksycznym działaniu na zdrowe tkanki [10, 141]. W szczególności, średnica hydrodynamiczna, ładunek powierzchniowy oraz bilans hydrofobowo-hydrofilowy są

kluczowe dla właściwości fizykochemicznych, które z kolei mają ogromny wpływ na biodystrybucję *in vivo* i eliminację podawanych nanocząstek [74].

1.3 Jedwab pajęczy

1.3.1 Wprowadzenie

Jedwab znany jest od wieków ze swoich niezwykłych właściwości mechanicznych [142]. Najmocniejszy spośród jedwabi, jedwab wiodący, jest jednym z najbardziej wytrzymałych materiałów znanych człowiekowi, zdecydowanie przewyższający materiały syntetyczne wyprodukowane przez człowieka [143]. Właśnie z uwagi na właściwości fizyczne, jedwab jest ciekawym materiałem do wykorzystania dla celów komercyjnych. Już na początku 18 wieku opisano techniki produkcji pończoch i rękawiczek z jedwabiu. Jako inne historyczne zastosowanie wskazuje się sieci rybackie oraz wykorzystanie pojedynczych włókien w celownikach. Ponadto, jedwabie od dawna mają szerokie implikacje medyczne. Istnieją zapisy mówiące o stosowaniu pajęczych jedwabi w medycynie ludowej na całym świecie – stosowane na otwarte rany mogły służyć do zatrzymania krwawienia i przyspieszenia procesu gojenia ran [144]. Ponadto, uważa się, że sieci pajęczce mają właściwości bakteriobójcze ze względu na wrodzoną odporność na mikroorganizmy [145]. Do potencjalnego zastosowania jako biomateriały, niezwykle istotnym warunkiem jest biokompatybilność. Badania *in vivo* wykazały, że jedwab jest biodegradowalny i wywołuje porównywalne reakcje obronne organizmu do materiałów rutynowo stosowanych w chirurgii [145]. Dlatego jedwab jest powszechnie wykorzystywany jako nici chirurgiczne [146].

Pomimo ogromnego zainteresowania i wysiłków ze strony naukowców, wciąż nie jesteśmy zdolni do wytwarzania włókien syntetycznych o tej samej wytrzymałości co naturalne jedwabne nici. Zrozumienie sposobu w jaki organizmy wytwarzają jedwab jest kluczowe w dążeniu do kopiowania złożonego systemu przędzenia, a tym samym, naśladowania niezwykłego jedwabnego polimeru [147, 148]. Poznanie tej tajemnicy natury może umożliwić produkcję lekkich, wysoko eksploatacyjnych materiałów dla licznych zastosowań, począwszy od trudnych, pochłaniających energię aplikacji takich jak spadochrony i kamizelki kuloodporne, kończąc na rusztowaniach do regeneracji tkanek [149]. Osiągnięcie to może zrewolucjonizować przemysł materiałowy, zapewniając przyjazny dla środowiska proces produkcji, w przeciwieństwie do metod obecnie dostępnych [147, 150].

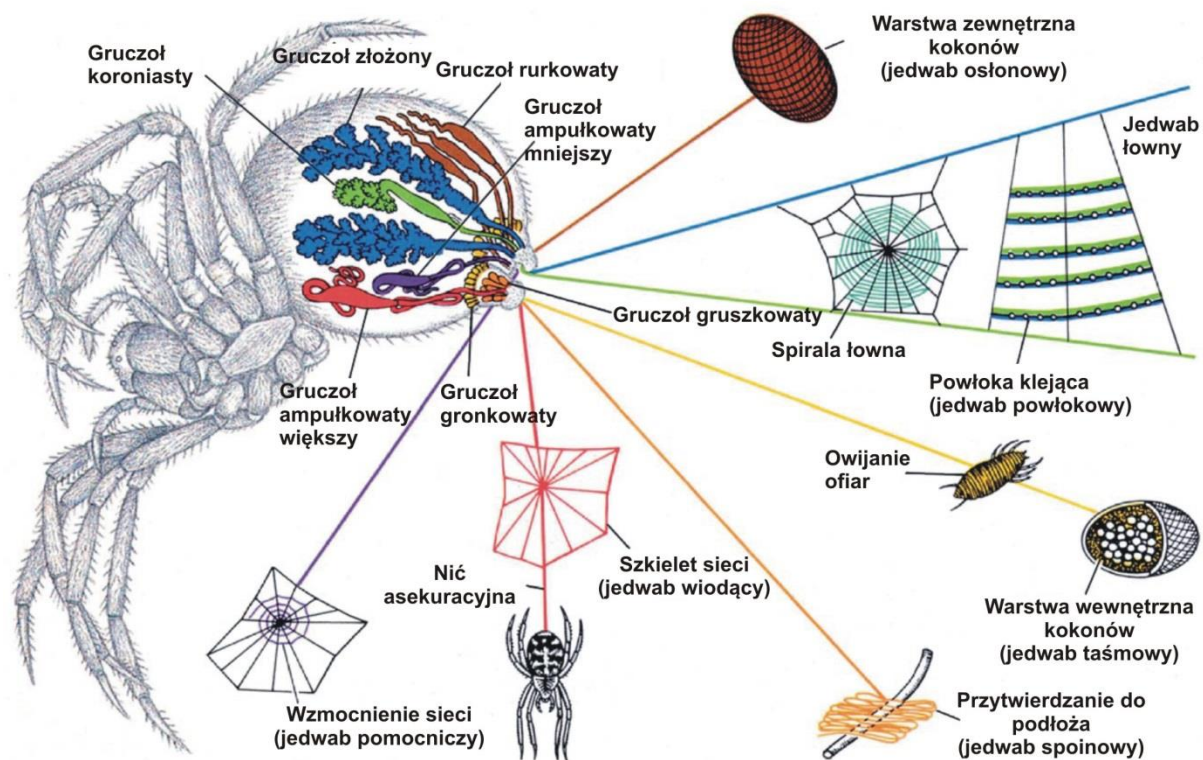
1.3.2 Co to jest jedwab

Jedwabie są to białka włókniste zawierające wysoce powtarzalne sekwencje aminokwasowe oparte głównie na alaninie i glicynie. Jedwabie są przechowywane w zwierzęciu w postaci cieczy, natomiast podczas wydzielania, zmieniają swoją konformację do włókien [143, 151, 152]. Jedwabne nici zbudowane są z białek posiadających obszar powtarzający się stanowiący rdzeń, otoczony przez niepowtarzalne N- i C-końcowe domeny [153, 154].

Jedwabie są produkowane wyłącznie przez stawonogi, i tylko zwierzęta z rodzaju Insecta, Arachnida i Myriapoda [155]. W przeciwieństwie do innych organizmów produkujących jedwab, pająki są w stanie wytworzyć kilka rodzajów jedwabiu i są zależne od niego przez całe życie [142]. Sukces ewolucyjny pająków jest ściśle powiązany z rozwojem wyspecjalizowanych gruczołów produkujących jedwabie posiadające różne funkcje [143, 155, 156].

1.3.3 Rodzaje i właściwości jedwabiu pajęczego

Największe i najbardziej istotne funkcjonalnie gruczoły jedwabne znajdują się w odwłoku pająka (Ryc. 5). Gruczoły jedwabne prawdopodobnie wywodzą się z wgłębienia naskórka czwartego i piątego segmentu tułowia i są zlokalizowane w tzw. kądziolkach przędnym, zwanych inaczej brodawkami przędnymi [157]. Każdy gruczoł jest połączony z kanałem wydzielniczym, prowadzącym do ujścia kądziolków [142]. Tkanie sieci jest cechą gatunkową w dwóch rodzinach pająków: Araneoidea i Deinopoidea, przy czym te pierwsze są najintensywniej badane. Pająki tkające sieci, które należą do rodziny Araneoidea (Ryc. 5), mogą posiadać do siedmiu różnych gruczołów jedwabnych, z których każdy produkuje jedwab o konkretnym przeznaczeniu i unikatowych właściwościach mechanicznych [158].



Ryc. 5 Rodzaje gruczołów przędných i typy produkowanych przez pająki jedwabi. Źródło: [159] (zmienione)

Jedwab wiodący (ang. dragline) jest produkowany w gruczołach ampułkowych większych (ang. major ampullate glands) i służy do tworzenia szkieletu sieci oraz lin asekuracyjnych [160]. Gruczoły ampułkowe mniejsze (ang. minor ampullate glands) wykazują podobieństwo morfologiczne do gruczołów ampułkowych większych i odpowiadają za syntezę nici pomocniczych służących do tworzenia spirali pomocniczej [161]. Najbardziej elastyczne włókna jedwabiu łownego (ang. flagelliform), są wytwarzane w gruczołach koroniastych i tworzą spiralę łowną sieci. Spirala łowna jest pokryta lepłą powłoką klejącą (jedwab powłokowy) produkowaną w gruczołach złożonych [161]. Jedwab spoinowy (ang. pyriform) produkowany przez gruczoły gruszkowate, jest stosowany do przytwierdzenia włókien do powierzchni i łączenia poszczególnych nici w sieci [162]. Do produkcji kokonów pająk wykorzystuje dwa rodzaje jedwabiu. Zewnętrzna warstwa składa się z jedwabiu osłonowego (ang. tubuliform), produkowanego w gruczole rurkowym, natomiast warstwa wewnętrzna jest złożona z nici taśmowych (ang. aciniform) pochodzących z gruczołów gronkowych [163]. Jedwab taśmowy jest również wykorzystywany do owijania i unieruchamiania ofiary. Różne jedwabie pajęcze i ich funkcje zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Rodzaje gruczołów przędnych, produkowanych jedwabi, ich funkcja oraz rodzaje białek budujących dane włókna.

Gruczoł	Jedwab	Funkcja	Białka nici
Ampułkowaty większy	Wiodący	Szkielet sieci, liny asekuracyjne	MaSp1, MaSp2
Ampułkowaty mniejszy	Pomocniczy	Wzmocnienie sieci, spirala pomocnicza	MiSp1, MiSp2
Koroniasty	Łowny	Spirala łowna	Flag
Gronkowaty	Taśmowy	Owijanie ofiar, warstwa wewnętrzna kokonów	AcSp1
Rurkowaty	Oślonowy	Warstwa zewnętrzna kokonów	TuSp1, ECP-1, ECP-2
Złożony	Powłokowy	Powłoka klejąca sieci łownej	SCP-1, SCP-2
Gruszkowaty	Spoinowy	Przytwierdzenie do podłoża, łączenie nici	PySp1

Źródło: [163, 164] (zmienione)

1.3.4 Budowa gruczołów przędnych na przykładzie gruczołu ampułkowego większego

Gruczoł ampułkowaty większy składa się z czterech podstawowych elementów: części cewkowej, worka gruczołowego, przewodu gruczołowego i ujścia (Ryc. 6). Funkcją części cewkowej gruczołu jest produkcja białek jedwabiu, zwanych spidroinami [142, 155]. Nabłonek części cewkowej posiada kolumnową organizację składającą się z jednego rodzaju komórek wydzielniczych. Komórki te mają duże jądra, dobrze rozwinięte szorstkie retikulum endoplazmatyczne (ER) i dużą ilość granulek wydzielniczych, co umożliwia wysokie tempo produkcji białek wydzielniczych [165].



Ryc. 6 Schemat budowy gruczołu przędniego pająka. Źródło: [164] (zmienione)

Białka wyprodukowane w części cewkowej zostają następnie zmagazynowane w postaci roztworu w worku gruczołowym. Spidroiny przechowywane są tutaj w formie wysoce stężonego wodnego roztworu (~30-50% w/w) zwanego mazią (ang. dope) [166, 167]. Wielkość worka gruczołowego jest większa w porównaniu z częścią cewkową gruczołu przędnego. Jednak, szybkość produkcji białka w pojedynczej warstwie nabłonka worka jest 4-krotnie niższa w porównaniu z szybkością produkcji obserwowanej w części cewkowej. Ponadto, całkowita objętość komórek nabłonkowych części cewkowej jest dziesięć razy większa porównując z komórkami w worku gruczołowym. W związku z tym, ilość białka powstałego w worku stanowi jedynie kilka procent całkowitej ilości spidroin wyprodukowanych w gruczole przędnym [155].

Przewód gruczołowy prowadzi od worka gruczołowego do ujścia. W przewodzie zachodzi przemiana wodnego roztworu białka magazynowanego w worku gruczołowym do nierozpuszczalnego w wodzie włókna. Ściana przewodu wyścielona jest jedną warstwą komórek nabłonkowych tworzących błonę wewnętrzną przewodu. Morfologia nabłonka dalszej części kanału wskazuje na jego rolę w transporcie wody i jonów. Przemiany biochemiczne i fizyczne determinują przejście białek jedwabiu z fazy ciekłej do stałej, co prowadzi do utworzenia niedojrzałych włókien. Istnieją dwie teorie opisujące mechanizm przemiany fazowej. Jeden z modeli zakłada, że białka w roztworze łączą się początkowo tworząc micelle o średnicy 100-200 nm, które grupują się z wytworzeniem globuli o wielkości kilku mikrometrów. Przepływ wzdłużny i siły ścinające powodują wydłużanie się globuli, co ostatecznie prowadzi do formowania włókien [168, 169]. Według drugiej teorii, roztwór białka zachowuje się jak ciekły kryształ, co może wynikać z jego dużej koncentracji w przewodzie gruczołu przędnego i ruchu wszystkich cząsteczek w jednym kierunku [165, 169]. Kanał kończy się ujściem znajdującym się w kądziolkach przędnych [170, 171]. Światło ujścia regulowane jest przez mięsień zlokalizowany na końcu przewodu. Tutaj dochodzi do ostatecznego dojrzewania włókna, które odbywa się w chwili wyciągania nici przez ujście oraz poprzez ostateczne odparowanie wody. Ma to bardzo duże znaczenie w kształtowaniu właściwości mechanicznych włókien. Proces formowania włókien podlega ścisłej kontroli, umożliwiając niemal nieprzerwane przedzenie pajęczej nici.

1.3.5 Budowa nici wiodącej

1.3.5.1 Rodzaje spidroin

W gruczole ampułkowatym większym złotego pająka jedwabnego *N. clavipes* produkowana jest jedwabna nić wiodąca, zbudowana z dwóch białek strukturalnych MaSp1 i

MaSp2 (z ang. major ampullate spidroin). Dla białek nici wiodącej pająka krzyżaka ogrodowego *A. diadematus* stosowane są nazwy ADF-3 i ADF-4 (z ang. Araneus diadematus fibroin). Białko ADF-4 odpowiada białku MaSp1, natomiast ADF-3 jest analogiem MaSp2 [172, 173].

1.3.5.2 Struktura organizacyjna MaSp1 i MaSp2

Mimo, że istnieją różnice struktury pierwszorzędowej pomiędzy dwoma spidroinami nici wiodącej oraz między ich odpowiednikami pochodzącymi od różnych gatunków pająków, wszystkie charakteryzują się podobną, silnie konserwatywną ogólną strukturą organizacją [142].

Spidroiny MaSp1 i MaSp2 składają się z niepowtarzających się regionów: N-końcowej (na wolnym końcu aminowym) i C-końcowej (na wolnym końcu karboksylowym sekwencji jedwabiu) domeny, które tworzą niezależne struktury trzeciorzędowe oraz części największej zbudowanej z fragmentów powtarzających się [171, 174]. Region powtarzalny, zdominowany przez aminokwasy z krótkimi lub bez łańcuchów bocznych (głównie Ala i Gly), jest umiejscowiony pomiędzy N- i C-końcowymi domenami [154, 155] (Ryc. 7).



Ryc. 7 Schemat ogólnej struktury organizacyjnej białek nici wiodącej jedwabiu pajęczego.

Spidroiny są białkami o dużej masie. Z pomocą różnych procedur eksperymentalnych ich wielkość oszacowano pomiędzy 260-720 kDa [155, 175]. Ponadto, za pomocą rozdziału białek w żelu SDS-PAGE w warunkach denaturujących i niedenaturujących wykazano ich dimeryczną strukturę, zależną od wiązań disiarczkowych [167]. Należy wspomnieć, że oznaczanie wielkości białek o wysokiej masie cząsteczkowej metodą rozdziału w żelu SDS-PAGE jest niedoskonałe. Białka bogate w glicynę i alaninę wykazują niezgodną z oczekiwaną migrację elektroforetyczną [197]. Może to częściowo wyjaśniać szeroki zakres mas cząsteczkowych określonych dla spidroin nici wiodącej.

1.3.5.2.1 Region powtarzalny

Region powtarzalny składa się z licznych bloków alaninowych zawierających kolejne powtórzenia 4-15 reszt – $(A)_n$, lub motywu poli-Gly-Ala – $(GA)_n$ występujących naprzemiennie z powtórzeniami bogatymi w glicyny o różnej długości [172]. Motywy $(A)_n$ i $(GA)_n$ są odpowiedzialne za formowanie drugorzędowej struktury β -kartki, wpływającej na sztywność i wytrzymałość jedwabnych włókien [169].

Łańcuchy bogate w glicyny zawierają długie powtórzenia 20-30 aminokwasów i mogą być podzielone na dwa główne motywy: GGX i GPGXX (X odnosi się do określonych aminokwasów) [176]. Kolejne powtórzenia motywu GPGXX tworzą spiralne β -zwroty stabilizowane przez wewnętrzne wiązania wodorowe. Nieprzerwane sekwencje tych motywów zapewniają jedwabnym włóknom moduł sprężystości podobny do spiralnych β -zwrotów elastyny [176]. Liczba powtórzeń kolejnych GPGXX odpowiada za wyjątkową sprężystość jedwabiu łownego, który jest bardzo rozciągliwy (200-500%) i jedwabiu nici wiodącej, który rozciąga się do 35%. Uważa się, że motywy GGX tworzą struktury 3₁-helikalne, których oddziaływanie warunkuje rozciągliwość jedwabiu [172, 176, 177].

Główne motywy w sekwencji MaSp1 są następujące: $(A)_n$, GA i GGX, natomiast dla MaSp2 dominują motywy $(A)_n$ i GPGXX [178].

1.3.5.2.2 Region N-końcowy

Domena N-końcowa białek nici wiodącej liczy około 130 aminokwasów [171, 179]. Przy pomocy spektroskopii dichroizmu kołowego określono jej strukturę drugorzędową. N-końcowy fragment białka składa się z pięciu α -helis, które są połączone względnie krótkimi pętlami [171, 179]. Domena N-końcowa reguluje zmiany odczynu. W pH panującym w worku gruczołowym (pH powyżej 7) domena ta hamuje agregację promując postać rozpuszczalną białek jedwabiu. Natomiast w pH wynoszącym około 6,3 promuje grupowanie spidroin i formowanie włókien [180].

1.3.5.2.3 Region C-końcowy

Wszystkie dotychczas zidentyfikowane białka jedwabiu wiodącego posiadają konserwatywną C-końcową domenę o długości około 100 reszt aminokwasowych [181]. Rola domeny C-końcowej nie została ostatecznie zdefiniowana, jednak kluczowym jest jej udział w tworzeniu włókien [154]. Domena ta zawiera odcinek hydrofobowy około 20 reszt aminokwasowych, które tworzą amfipatyczną α -helisę. Część helikalna jest zaangażowana w oddziaływania hydrofobowe między spidroinami, ułatwiając w ten sposób formowanie

mostków dwusiarczkowych [174, 181]. Domena C-końcowa wraz z umiejscowionym w jej obrębie mostkiem dwusiarczkowym umożliwia odpowiednie pozycjonowanie sekwencji powtarzających się między cząsteczkami białka. Poza funkcją tworzenia międzycząsteczkowych wiązań disiarczkowych, może również być istotna dla utrzymania jedwabiu w roztworze, zapobiegając niepożądaną agregacji białek w czasie magazynowania. Domena ta jest niewrażliwa na zmiany pH [182].

1.3.6 Właściwości mechaniczne jedwabiu

Struktura drugorzędowa motywów aminokwasowych powtarzalnego regionu białka wpływa na właściwości mechaniczne nici wiodącej jedwabiu [183]. Łańcuchy alaninowe łączą białka razem i nadają włóknu jego siłę i wytrzymałość. Rozciągliwość włókien jest związana z amorficzną macierzą zawierającą motywy bogate w glicyny, jak GPGXX i GGX tworzące struktury helikalne [156]. Zmienność długości i składu aminokwasowego domen powtarzalnych pomiędzy jedwabiami wiodącymi różnych gatunków pajaków, przynajmniej częściowo, może wyjaśnić różnice w ich właściwościach mechanicznych [143]. Jednakże, mechaniczne cechy jedwabnych nici różnią się znacznie nie tylko pomiędzy gatunkami, ale także w obrębie gatunku, a nawet w ramach osobnika. Na właściwości jedwabiu wiodącego wpływa bowiem wiele zmiennych, takich jak dieta, tempo przędzenia, temperatura czy wilgotność otoczenia [157].

Właściwości mechaniczne nici jedwabiu wiodącego, innych biomateriałów oraz materiałów syntetycznych zestawiono w tabeli 2. Jedwab wiodący cechuje się wytrzymałością podobną do Kevlaru przy jednoczesnej znacznie większej rozciągliwości (odpowiednio, jedwab wiodący 35%, Kevlar 5%), przez co przewyższa wszystkie inne znane materiały [176, 184]. Wprawdzie przy pękaniu pochłania ponad 10 000 razy mniej energii niż jedwab taśmowy, jego wiązkość (energia pękania) jest nadal 10 razy większa od Kevlaru i ponad 100-krotnie większa od wiązkości ludzkiego ścięgna.

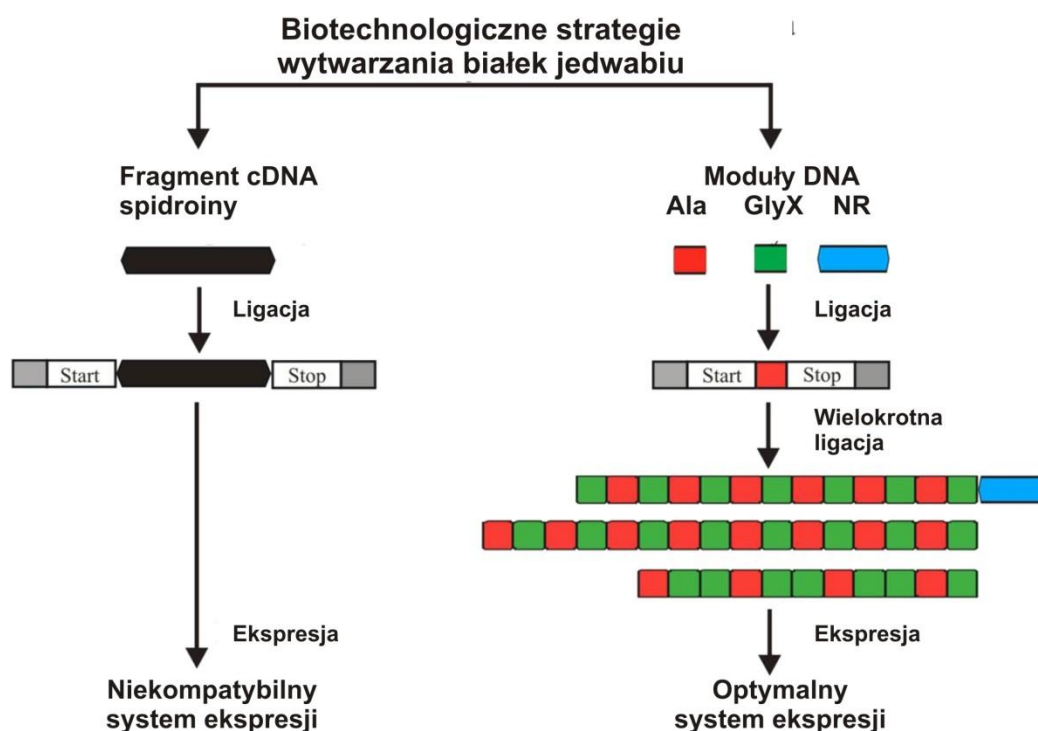
Tabela 2. Właściwości mechaniczne pajęczego jedwabiu nici wiodącej i innych materiałów.

Material	Wytrzymałość [GPa]	Sztywność [GPa]	Rozciągliwość [%]	Wiążkość [MJ/m³]
Jedwab wiodący	0,8 – 1,5	7 – 11	22 – 39	140 – 284
Jedwab <i>B. mori</i>	0,6	7	18	70
Ściągno	0,12	1,2	13	6
Kauczuk	0,05	0,001	850	100
Kevlar	3,6	130	2,7	50
Stal	1,5	200	0,8	6

Źródło: [142] (zmienione)

1.3.7 Biotechnologiczne wytwarzanie jedwabiu pajęczego

Niezwykle właściwości nici jedwabiu pajęczego mogłyby znaleźć wiele zastosowań jeśli materiał byłby łatwo dostępny [185]. Dlatego w ostatnich latach wiele badań stosowanych skupia się na optymalizacji produkcji masowej jedwabnych włókien. W przeciwieństwie do jedwabnika morwowego, pająki nie mogą być hodowane ze względu na ich terytorialną i kanibalistyczną naturę [169]. Dlatego też, w celu uzyskania dużej ilości nici pajęczej do zastosowań przemysłowych, badacze podjęli próby sklonowania jedwabnych genów i ich nadekspresji w bakteriach, drożdżach, a także roślinnych i ssących systemach ekspresyjnych oraz zwierzętach transgenicznych [186]. Jak przedstawiono na rycinie 8, ekspresja spidroin najczęściej obejmuje zastosowanie fragmentów cDNA spidroin lub syntetycznych genów opartych na konsensusowych powtórzeniach sekwencji natywnych [177, 187-191].



Ryc. 8 Biotechnologiczne strategie wytwarzania białek jedwabiu pajęczego. Źródło: [164] (zmienione)

1.3.7.1 Strategia wytwarzania naturalnych białek jedwabiu pajęczego

Produkcja naturalnego pajęczego jedwabiu w różnych systemach ekspresyjnych jest utrudniona. Wynika to z kilku czynników. Powtarzalny charakter genów często prowadzi do niestabilności genetycznej insertów, będącej wynikiem rekombinacji homologicznej. Sekwencje bogate w G i C oraz powtarzalne łańcuchy mRNA mogą tworzyć niepożądane wyższe struktury drugorzędowe, które utrudniają translację i powodują odłączenie matrycy od rybosomów. Ponadto, komórki wytwarzające spidroiny u pajaków, w przeciwieństwie do komórek pochodzących z innych źródeł, mają zwiększoną pulę tRNA, które biorą udział w translacji sekwencji bogatych w Ala i Gly [192-194]. W systemach ekspresji rekombinowanych białek częste wykorzystanie tych aminokwasów powoduje duże obciążenia, z którymi nie radzi sobie system translacji pozbawiony odpowiednich tRNA. Ograniczenia te mogą powodować niejednorodny rozkład masy cząsteczkowej białek pajęczych z występowaniem znacznej ilości przedwcześnie zakończonych fragmentów białek [185, 192, 195, 196]. Ponadto, poważną przeszkodą są problemy z rozpuszczalnością białka, ponieważ prowadzą do znacznego obniżenia wydajności produkcji oraz wymuszają używanie środków denaturujących w procesie oczyszczania [197]. Obserwuje się tworzenie

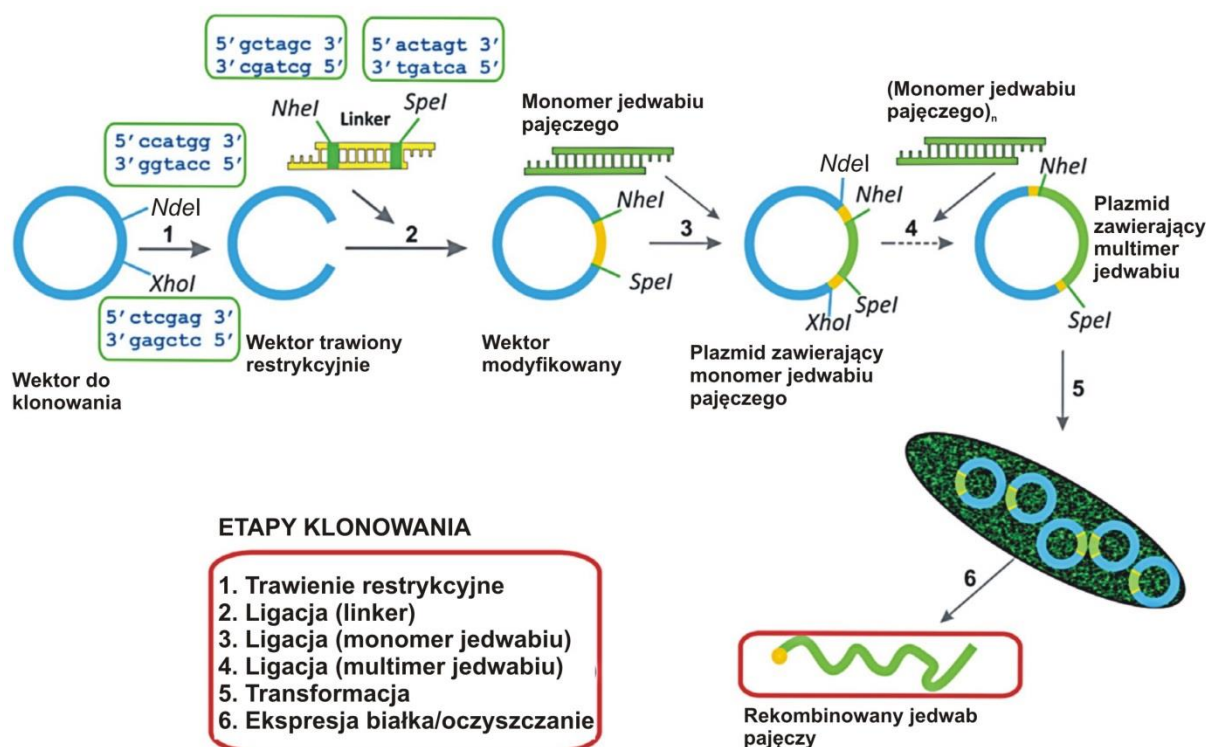
zagregowanych, nierozpuszczalnych białek oraz trudności uzyskania białek sekrecyjnych. Konieczna jest więc optymalizacja warunków produkcji oraz zastosowanie różnych systemów ekspresyjnych.

1.3.7.2 Strategia wytwarzania bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego

Druga strategia produkcji białek jedwabiu pajęczego wykorzystuje techniki inżynierii genetycznej. Powtarzalne motywy aminokwasowe spidroin stanowią podstawę konstrukcji syntetycznych oligonukleotydów naśladujących jedwabne moduły, które są następnie poddane multimeryzacji do większych genów [190, 196, 198] (Ryc. 9). Rozmiar powstałych w ten sposób genów może być łatwo regulowany. Ponadto, syntetyczne geny mogą być zaprojektowane z uwzględnieniem kodonów preferowanych przez organizm gospodarza, w którym będzie produkowane białko. Ma to na celu podniesienie wydajności ekspresji [190, 196, 197].

Strategia bioinżynierowanych białek umożliwia produkcję rekombinowanych pajęczych jedwabi o zaprojektowanej sekwencji, strukturze drugorzędowej i dokładnym ciężarze cząsteczkowym [199]. Istnieją cztery główne etapy procesu: (i) zaprojektowanie syntetycznego modułu jedwabiu (monomer) z dostosowaniem sekwencji DNA do komórki gospodarza poprzez optymalizację kodonów do danego systemu ekspresyjnego i dostosowaniem jedwabnych modułów do kasety ekspresyjnej wektora, (ii) dostosowanie kasety ekspresyjnej wektora, (iii) ligacja i multimeryzacja modułów jedwabiu, oraz (iv) ekspresja i oczyszczanie bioinżynierowanego białka jedwabiu [186]. Rycina 9. podsumowuje strategię inżynierii genetycznej wykorzystaną do produkcji jedwabnego polimeru.

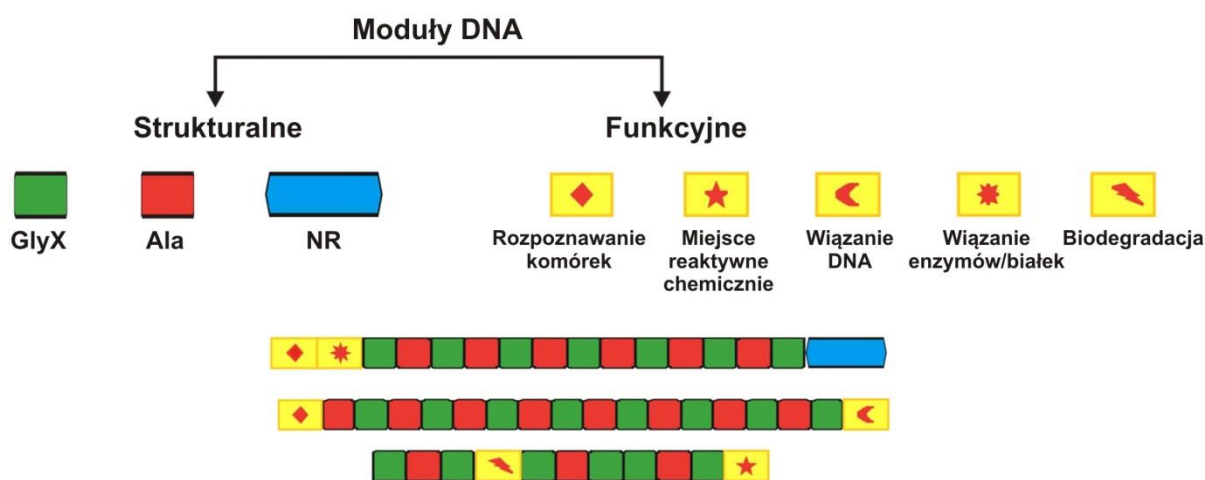
Sekwencje monomerów genów jedwabiu są syntetyzowane jako krótkie, jednoniciowe odcinki oligonukleotydowe (do 100 par zasad) lub stanowią produkt reakcji PCR z biblioteki cDNA. Na końcach 3' i 5' znajdują się odcinki DNA pozwalające na kontrolowaną ligację. Są one rozpoznawane przez dwa różne enzymy restrykcyjne, generujące komplementarne do siebie lepkie końce. Sekwencja DNA jest podwajana w procesie ukierunkowanej ligacji, a prawidłowa orientacja insertu jest weryfikowana w wyniku analizy restrykcyjnej. W pozycji prawidłowego połączenia sekwencji, miejsce restrykcyjne nie jest odtwarzane [164, 200-202]. W ten sposób można łączyć dowolną liczbę powtarzających się modułów. Znane są przykłady 4-96 powtórzeń bioinżynierowanych białek pajęczych opartych głównie na sekwencjach konsensusowych białek MaSp1, MaSp2 i Flag pochodzących od pajaków *N. clavipes* i *A. diadematus* [203, 204].



Ryc. 9 Strategia konstrukcji bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego. Źródło: [186] (zmienione)

1.3.7.3 Funkcjonalizacja bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego

Istotną zaletą strategii białek konstruowanych na poziomie DNA jest możliwość przyłączenia do sekwencji kodującej bioinżynierowany jedwab pajęczy sekwencji kodujących funkcjonalne polipeptydy [199, 205]. Tym sposobem można tworzyć różne warianty białek o określonych właściwościach fizycznych i funkcjonalnych, gdzie jedwabna sekwencja determinuje strukturę biomateriału, a sekwencja przyłączonej domeny funkcyjnej odpowiada za nową cechę powstałej chimery. Bioinżynierowane białka jedwabiu mogą być funkcjonalizowane przez wprowadzenie miejsc chemicznie reaktywnych, pozwalające na późniejszą (po utworzeniu odpowiedniej struktury) modyfikację biomateriału, czy też sekwencji peptydowych rozpoznających/wiążących metale, enzymy, receptory komórkowe, itp. Przykłady funkcjonalizacji rekombinowanych białek przedstawia Ryc. 10.



Ryc. 10 Schemat funkcjonalizacji bioinżynierowych białek jedwabiu pajęczego. Źródło: [164] (zmienione)

Przykładem białek funkcjonalizowanych są białka zawierające dodatkowe pojedyncze aminokwasy np. cysteinę, metioninę, czy też sekwencje polipeptydowe, pozwalające na przyłączenie cząstek aktywnych lub kontrolę struktury jedwabiu [206]. Ponadto, uzyskano rekombinowane białka jedwabiu zawierające domeny funkcyjne, takie jak sekwencja wiążąca krzemionkę (peptyd R5) pochodząca od białka silafiny [207-209] lub fragment białka macierzy dentyny 1 (CDMP1) zapewniający zdolność wiązania i gromadzenia cząsteczek hydroksyapatytu wapnia (HA) [210]. Domeny te poprzez selektywne oddziaływanie z komponentami nieorganicznymi generują nowatorskie organiczno-nieorganiczne kompozytowe systemy materiałowe [211]. Wymienione funkcjonalizacje mogą znaleźć zastosowanie dla potrzeb medycyny regeneracyjnej [208]. Znanym przykładem funkcjonalizacji jedwabiu jest przyłączenie fragmentu białka elastyny (ELP) [212, 213]. Białka fuzyjne jedwabiu z fragmentem białka elastyny mogą znaleźć wykorzystanie jako podłoże do wzrostu komórek lub kontrolowany system dostarczania genów [214]. Najczęściej wykorzystywanym motywem polipeptydowym nadającym funkcję jest peptyd RGD, będący składową fibronektyny, który odpowiada za wiązanie do receptorów znajdujących się na powierzchni błony komórkowej. Jest on wykorzystywany w celu zwiększenia adhezji biomateriału do komórek [215]. Ponadto istnieją doniesienia dotyczące nowego systemu dostarczania genów, który opiera się na fuzji polimerów opartych na jedwabiu pajęczym z kationową sekwencją poli(L-lizyny) wiążącą DNA. Ponadto dołączenie domeny RGD do domen poli(L-lizyny) wzmacnia wydajność procesu transfekcji [216]. Najnowsze doniesienia opisują fuzję jedwabiu z krótkimi peptydami penetrującymi komórki i destabilizującymi

blonę komórkową (CPP, ang. cell penetrating peptides) [217, 218]. Ich przyłączenie wraz z zastosowaniem domen poli(L-lizyn) również wzmacnia transfer genów. Innymi przykładami są peptydy przeciwbakteryjne [219], sekwencja wiążąca nukleolinę (peptyd F3) [220, 221], peptydy rozpoznające nowotwory (THP) [220]. Białka jedwabiu zawierające peptydy rozpoznające komórki nowotworowe mogą znaleźć zastosowanie do specyficznego dostarczania leków w terapii nowotworów.

1.3.7.4 Zastosowanie bakteryjnego systemu ekspresji

Rekombinowane białka jedwabiu pajęczego w większości przypadków są produkowane w systemie *E. coli*, ze względu na możliwość łatwej optymalizacji, krótki czas produkcyjny, stosunkowo niski koszt i możliwość produkcji jednorazowo dużych ilości białka [164, 202, 222, 223]. Pierwsze próby biotechnologicznej produkcji naturalnych spidroin pająka *N. clavipes* przeprowadzono właśnie w bakteryjnym systemie ekspresji. Wykorzystano fragment sekwencji cDNA długości 1500 oligonukleotydów C-końca białka MaSp1 [192]. Wyprodukowano analogi białek jedwabiu o masie cząsteczkowej do 163 kDa, jednak zaobserwowano brak ciągłości translacji i związane z tym produkty o mniejszej masie cząsteczkowej. Wyraźny spadek wydajności produkcji białka prawdopodobnie wynikał z faktu, że *E. coli* nie rozpoznaje efektywnie kodonów sekwencji jedwabiu pajęczego, tj. ma inną częstość ich występowania.

Syntetyczne geny skonstruowano wykorzystując sekwencje konsensusowe domen powtarzalnych białek MaSp1 i MaSp2 pająka *N. clavipes*. W oparciu o multimeryzację zaprojektowano geny o różnych rozmiarach, które następnie poddano ekspresji w *E. coli*. W miarę zwiększania rozmiaru genu obserwowano spadek wydajności ekspresji białek [197]. Białka o masie cząsteczkowej 15-41 kDa wyprodukowano w ograniczonym zakresie (2-15 mg/l hodowli bakteryjnej), pomimo wysokich gęstości komórek w procesie fermentacji. Niska wydajność produkcji mogła być związana z wysoką zawartością G i C (43–45%), co generuje tworzenie struktur drugorzędowych mRNA, utrudniając ekspresję białka. Ponadto, białka charakteryzowały się słabą rozpuszczalnością [197]. Podobnie, skonstruowano syntetyczny gen MaSp2 i otrzymano produkt o długości 58 kDa po ekspresji białka w systemie bakteryjnym. Obserwowano pojawienie się wariantów o niższej masie cząsteczkowej, co jednak wynikało z cięcia proteolitycznego w trakcie procesu oczyszczania, a nie z przedwczesnej terminacji translacji [190]. W kolejnych próbach produkcji syntetycznych analogów białek MaSp, obserwowano spadek wydajności i jednorodności wytwarzanych białek prawdopodobnie ograniczony przez przedwczesną terminację translacji

[196]. Problemy wynikające głównie z dużej zawartości glicyny, można zminimalizować poprzez modyfikację bakterii ekspresyjnych. Przykładem jest wprowadzenie zmian w szlaku metabolicznym glicylo-tRNA *E. coli* [204]. Glicylo-tRNA jest syntetyzowany poprzez przyłączenie glicyny do tRNAGly w obecności syntetazy glicylo-tRNA. Nadekspresja odpowiednich tRNAGly (rozpoznających kodony GGC i GGU) umożliwiła zwiększenie puli odpowiednich tRNA, co z kolei zapewniło bardziej wydajne wytwarzanie większych fragmentów białka. Xia i wsp. uzyskali dalsze podwyższenie wydajności dzięki wprowadzeniu genu odpowiedzialnego za syntezę glicyny (*glyA*). W oparciu o tę strategię wyprodukowano bioinżynierowane białka MaSp1, zawierające różną liczbę powtórzeń monomerów (32-96). Masa cząsteczkowa otrzymanych białek wynosiła odpowiednio 100,7-284,9 kDa [204].

Proces oczyszczania rekombinowanych białek istotnie wpływa na ostateczną ilość pozyskanego białka. Większość jedwabnych białek wytwarzanych metodami rekombinowanymi ze względu na niską rozpuszczalność, zazwyczaj wymaga do procedury oczyszczania stosowania silnych czynników denaturujących jak hydrochlorek guanidyny czy mocznik [175, 191, 192, 196, 224]. Ze względu na odporność białek jedwabiu pajęczego na kwasy organiczne, mogą być one wykorzystane do lizy komórek bakteryjnych, powodując zwiększenie rozpuszczalności i wzbogacenie frakcji rekombinowanych białek jedwabiu przy jednoczesnym wytrąceniu białek bakteryjnych [175]. Zastosowanie kwasu organicznego do lizy komórek bakteryjnych pozwala na uzyskanie 4–5-krotnie większej ilości białka niż użycie buforu zawierającego 8 M mocznik [175, 200]. Syntetyczny gen spidroiny z *N. clavipes* zawierający naturalny C-końcowy fragment domeny oczyszczano stosując środki denaturujące, które jednak pozwalały na uzyskanie niskiej wydajności (4 mg/l) białek o masie 43 kDa [192]. W celu zwiększenia wydajności, te same białka traktowano kwasami organicznymi w trakcie procedury oczyszczania, przez co wydajność wzrosła do 15 mg/l.

W bakteryjnym systemie ekspresyjnym z powodzeniem wyprodukowano ponadto rekombinowane warianty białek nici wiodącej pająka *A. diadematus* (ADF-3 i ADF-4), składające się z domeny opartej na sekwencjach powtarzalnych, przyłączonej do natywnej domeny C-końcowej. Zastosowanie bioreaktora pozwoliło zwiększyć wydajność wytwarzanego białka z 10-30 mg/l hodowli do 140-360 mg/l hodowli bakteryjnej [224]. Białka oczyszczono stosując bardzo prostą, dwustopniową metodę termiczną. Stabilność termiczna białek jedwabiu została wykorzystana podczas początkowych etapów procesu oczyszczania. Lizaty *E. coli* poddawano termicznej denaturacji w temperaturze 70 – 80 °C

przez 10 – 20 minut, co pozwoliło na wytrącenie białek bakteryjnych, natomiast pajęcze spidroiny pozostawały w postaci rozpuszczalnej. Białka jedwabiu następnie wytrącano siarczanem amonu (20 – 30%) [191, 224].

1.3.7.5 Zastosowanie innych systemów ekspresji

Jako organizmy eukariotyczne, drożdże posiadają system transkrypcji i translacji bardziej dostosowany do ekspresji genów kodujących rekombinowane białka jedwabiu pajęczego. Ponadto, zdolność wydzielania białek do pożywki zewnątrzkomórkowej oferuje dodatkowe korzyści, takie jak uproszczenie procedur oczyszczania prowadzące do obniżenia kosztów [185]. Podobnie jak w przypadku wytwarzania analogów spidroin w *E. coli*, sekwencje genowe zoptymalizowano dla preferencji kodonów *P. pastoris*. W drożdżowym systemie ekspresji produkowano syntetyczne powtórzenia multimerów MaSp1 i MaSp2 pająka *N. clavipes* o długości nawet do 3000 kodonów. Geny o długości przekraczającej 1600 kodonów osiągały mniejszą wydajność w porównaniu z krótszymi genami osiągającymi wysoką wydajność 1g/l hodowli. Jednakże występowały problemy z procesem oczyszczania białka z powodu tworzących się agregatów [195].

Najbardziej zaawansowana technologia produkcji białek wykorzystuje komórki ssaków. Udane próby ekspresji fragmentów cDNA kodujących białka MaSp1 i MaSp2 pająka *N. clavipes* i ADF-3 pająka *A. diadematus* uzyskano w komórkach nabłonkowych bydłowych gruczołów piersiowych (MAC-T) oraz komórkach nerkowych chomika (BHK) [189].

Ponadto, fragmenty C-końcowe białek ADF-3 i ADF-4 o masie około 60 kDa zostały wyprodukowane w komórkach owadzych (Sf9). ADF-3 wyprodukowano jako rozpuszczalne białka podczas gdy ADF-4 uległo wewnątrzkomórkowej agregacji. Włókna o średnicy 200 nm – 1 μ m i długości do 100 mikrometrów, utworzone z ADF-4 stwierdzono w cytoplazmie [203].

Inne strategie obejmowały ekspresję fragmentów spidroin w roślinach czy zwierzętach transgenicznym. Białka jedwabiu o ciężarze cząsteczkowym do 100 kDa otrzymano w transgenicznym tytoniu, ziemniaku czy rzodkiewniku pospolitym [225]. Wykorzystano również do produkcji zwierzęta transgeniczne np. myszy [161], jednak wydajność produkcji była niska, a koszt bardzo wysoki. Ponadto, podjęto próby produkcji spidroin wydzielanych do mleka kóz transgenicznym. Wadą tej metody było niewielkie stężenie białek jedwabiu w mleku [226]. Istnieją także doniesienia opisujące ekspresję fragmentu białka MaSp1 pająka *N. clavipes* w kokonach transgenicznym jedwabników morwowych (*B. mori*) [227].

1.3.8 Wytwarzanie biomateriałów opartych na jedwabiu pajęczym

W warunkach sztucznych możliwe jest indukowanie kontrolowanego przejścia białek jedwabiu z fazy ciekłej do stałej przy jednoczesnym nadawaniu pożądanego kształtu tworzonemu biomateriałowi [228]. Naturalne białka jedwabiu mogą być przechowywane w wysokich stężeniach bez wystąpienia niepożądanego agregacji wewnątrz worka gruczołowego pająków. Gdy jest to konieczne, w odpowiedzi na czynnik chemiczny lub bodziec mechaniczny, pająki w ściśle kontrolowany sposób wyzwalają produkcję włókien z magazynowanych białek. W warunkach *in vitro*, jedwabne polimery mogą podlegać samoorganizacji prowadzącej do zwiększenia zawartości β -katek, wywołanej ekspozycją na czynnik chemiczny [158, 189, 229]. Inne bodźce, takie jak rozciąganie (imitujące siły ciągnące występujące w naturze), czas przechowywania, ogrzewanie, pH, siła jonowa lub promieniowanie UV również indukują przekształcenia w struktury β -katek. Poprzez dobór odpowiednich warunków można regulować zawartość β -katek, co bezpośrednio wpływa na właściwości i funkcje otrzymanych materiałów [189, 191].

Oprócz włókien, bioinżynierowane białka jedwabiu mogą być przetwarzane w różnorodne formy morfologiczne. Stosując optymalne zestawienie wymienionych wyżej warunków pomyślnie wyprodukowano hydrożele, pianki, mikrosfery, mikrokapsułki, filmy czy rusztowania [169, 230]. Metody wytwarzania wybranych struktur z białek jedwabiu pajęczego przedstawiono poniżej.

1.3.8.1 Włókna

Rekombinowane białka jedwabiu mogą zostać przekształcone we włókna z zastosowaniem metod mokrego przędzenia, elektroprzędzenia lub metod opartych na mikroprzepływie [231]. Jednakże, właściwości fizyczne włókien sztucznie wyprodukowanych są słabsze o rząd wielkości w porównaniu z właściwościami naturalnego jedwabiu. Na mechaniczną wytrzymałość oraz strukturę włókna znaczący wpływ ma wielkość białka użytego do jego wytworzenia. Wykazano, że im większe białko, tym właściwości uzyskanej z niego nici są bardziej zbliżone do właściwości naturalnej pajęczej nici [231-233]. Ponadto, obecność końcowych, niepowtarzających się domen białka jedwabiu odgrywa ważną rolę w procesie formowania się włókien, poprzez promowanie agregacji białek wzdłuż długiej osi włókna i zapobieganie niepożądanego nieuporządkowanej agregacji [182, 194].

1.3.8.2 Hydrożele

Hydrożele są trójwymiarowymi sieciami polimerowymi, zdolnymi do wchłaniania roztworów wodnych bez jednoczesnego rozpuszczania się w nich. Z roztworu białek

jedwabiu jest formowany żel, gdy ich stężenie jest na tyle wysokie, aby utworzyć ciągłą sieć polimeru. W sieci polimeru jest uwięziona faza ciekła. Żelowanie jest indukowane przez niskie pH i obecność jonów Ca^{2+} . Wydłużenie czasu inkubacji powoduje asocjację uzyskanych nanofibryli w sieć, z wytworzeniem hydrożelu [234]. Hydrożele wykorzystywane są w inżynierii tkankowej do formowania podłoży do wzrostu komórek lub jako systemy kontrolowanego, powolnego uwalniania substancji aktywnych np. cytokin [235].

1.3.8.3 Filmy

Jedwabne filmy, czyli cienkie błony mogą być uzyskane przez całkowite odparowanie rozpuszczalnika (np. HFIP, wody) z roztworu białka. Inkubacja wytworzonego filmu w roztworze metanolu powoduje dodatkowo wzbogacenie zawartości struktury β -kartki, a przez to zwiększa mechaniczną wytrzymałość filmu. Otrzymane filmy są stabilne w warunkach denaturujących, takich jak wysokie stężenia mocznika i chlorowodoru guanidyny. Do wielu zastosowań niezbędne jest jednak nadanie jedwabiom nowej funkcji poprzez modyfikacje chemiczne gotowego filmu, bądź genetyczne modyfikacje białka użytego do produkcji filmu [169, 194]. Powierzchnia filmu doskonale nadaje się do hodowli komórek tkanki łącznej, gdyż pobudza nie tylko ich wzrost, ale także wytwarzanie substancji międzykomórkowej [236]. Właściwości filmów mogą być wykorzystane do projektowania opatrunków wspomagających regenerację skóry po oparzeniach. Ponadto, po odpowiedniej modyfikacji, mogą służyć do kontrolowanego uwalniania leków lub innych substancji aktywnych, działać jako biosensory lub stanowić rusztowania do wzrostu komórek w inżynierii tkankowej [237, 238].

1.3.8.4 Rusztowania

Rusztowania mogą być uzyskane z roztworu jedwabiu w wyniku metody ługowania soli. Pierwszym etapem jest ekstrakcja jedwabiu. Jedwab po ekstrakcji zostaje rozpuszczony w rozpuszczalniku (np. LiBr), a następnie dializowany do wody. Do wodnego roztworu białek jedwabiu dodawana jest substancja porogenna (np. kryształki chlorku sodu). W wyniku inkubowania roztworu jedwabiu z solą i po wypłukaniu soli, powstają porowate trójwymiarowe rusztowania. Jedwabne rusztowania można poddać działaniu alkoholu (np. metanol) w celu zwiększenia struktury β -kartki. Stężenie i rodzaj porogenu warunkuje rozmiar porów [239]. Obecnie porowate rusztowania do trójwymiarowej hodowli komórek z powodzeniem uzyskuje się z jedwabiu naturalnego pochodzącego od jedwabników. Jedwabne rusztowania oferują wszechstronne możliwości zastosowań dla potrzeb inżynierii tkankowej do odbudowy kości, więzadeł, ścięgien, naczyń krwionośnych i chrząstki. Podjęto próby

produkcji tych struktur z naturalnego jedwabiu pajęczego [239]. Istnieją również doniesienia o wytworzeniu trójwymiarowych rusztowań z bioinżynierowanego jedwabiu opartego na sekwencji MaSp1 pająka *N. clavipes*, jednakże niedostateczna ilość materiału stanowi poważne ograniczenie tej metody [177, 235, 240].

1.3.8.5 Kapsułki

Mikrokapsułki z jedwabiu pajęczego otrzymano poprzez kontrolowane spontaniczne składanie polimeru na styku fazy olej – woda. Metoda polega na adsorbowaniu na granicy faz białek jedwabiu, przy natychmiastowej zmianie ich konformacji na strukturę β -kartki. Kropelki fazy wodnej są otaczane przez białkowy film i w ten sposób są kapsułkowane płaszczem polimeru [169, 194]. System taki może dostarczać substancje aktywne przez zamknięcie w bańce polimeru leków lub czynników diagnostycznych.

1.3.8.6 Sfery

Wytwarzanie sfer z rekombinowanych białek jedwabiu jest możliwe dzięki zastosowaniu metod wykorzystujących wzajemne oddziaływanie rozpuszczalnika (metanol, aceton) i białka lub proces wysalania białek powyżej krytycznego stężenia fosforanu potasu. W drugiej z metod, tworzenie sfer następuje w wyniku mechanizmu wysalania białek przez wyodrębnienie się z roztworu rozproszonych kropel fazy bogatej w białko. Wynikiem enukleacji pod wpływem jonów fosforanowych są przekształcenia konformacyjne oddziałujących białek i wzrost sfer. Wzrost sferyczny ma miejsce do momentu gdy stężenie białka w fazie bogatej w białko nie przekracza granicy rozpuszczalności. Wielkość sfer zależy od stężenia białka i warunków mieszania [194, 241-243]. Mikro- i nanosfery mogą służyć jako system dostarczania substancji czynnych, umożliwiając precyzyjną przestrzenną oraz czasową kontrolę uwalniania leku i zapewniając pożądany efekt terapeutyczny [206].

1.3.9 Zastosowania biomedyczne jedwabnych biomateriałów

Terminami ściśle związanymi z technologią biomateriałów są: (i) biofunkcjonalność, tj. zdolność implantowanego materiału do zrealizowania zaprogramowanego zadania oraz (ii) biokompatybilność, oznaczająca bezpieczeństwo biologiczne, tj. brak odpowiedzi lokalnej, brak reakcji ogólnoustrojowej i brak cytotoksyczności, jak również brak właściwości mutagennych/rakotwórczych. Dokładne znaczenie terminu biokompatybilności jest niejasne, co wynika z faktu, że materiał, który powoduje niedopuszczalne reakcje zapalne w jednym typie tkanki nie musi wywoływać tego efektu w drugim typie, a stopień reakcji zapalnej, która może być tolerowana, różni się w zależności od zamierzonego zastosowania [240]. Liczne badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że rekombinowany jedwab pajęczy jest biokompatybilny.

Biokompatybilność białek jedwabiu, a dodatkowo biodegradowalność, wyjątkowe właściwości mechaniczne oraz zdolność tworzenia zróżnicowanych form morfologicznych czyni z jedwabi podstawę do wytwarzania biomateriałów o korzystnych z punktu widzenia medycyny właściwościach.

Znane są przykłady wykorzystania jedwabiu w medycynie regeneracyjnej, np. rusztowanie do odbudowy tkanek. Uzyskiwane z jedwabiu pajęczego stabilne formy morfologiczne, w tym filmy, rusztowania i hydrożele doskonale odzwierciedlają strukturę 2D lub 3D dla potrzeb inżynierii tkankowej. Biomateriały wytworzone z naturalnych lub bioinżynierowanych białek jedwabiu, modyfikowanych poprzez przyłączenie peptydu RGD lub specyficznych czynników wzrostu komórek (np. hormon PTH, białko BMP-2) wzmagają interakcje międzykomórkowe i odwzorowują środowisko macierzy zewnątrzkomórkowej [244]. Znane jest zastosowanie funkcjonalizowanych białek do promowania przylegania, rozprzestrzeniania, proliferacji i różnicowania komórek osteoblastów [245], fibroblastów [246], oraz komórek zrębowych szpiku kostnego [247]. Ponadto, jedwab pajęczy jest testowany jako materiał wspierający proliferację komórek Schwanna, umożliwiając zaprojektowanie sztucznego nerwu [248]. Nie wykryto wydzielania czynników prozapalnych wpływających na odnowę tkanek w trakcie gojenia ran w przypadku hodowli fibroblastów na powierzchniach pokrytych jedwabnym filmem lub na rusztowaniach 3D wytworzonych z jedwabiu. Hydrożele oraz filmy mogą więc znaleźć zastosowanie w produkcji bandażu czy opatrunków na rany. Ponadto, bardzo zbliżone do elementów macierzy zewnątrzkomórkowej wydają się być jedwabne nanowłókna, powstałe w wyniku elektroprzędzenia, które powiązane ze sobą tworzą sieć o wielkości porów w zakresie mikrometrów. Takie włókniste struktury (maty, rusztowania) mogą być stosowane w medycynie regeneracyjnej kości. Zręby oparte na jedwabiu dla tworzenia kości oferują możliwości wyeliminowania ograniczeń dostępnych obecnie materiałów, takich jak kolagen (ograniczone właściwości mechaniczne), PLGA (indukowanie stanu zapalnego) i hydroksyapatyt (nie jest całkowicie biodegradowalny) [245]. Ponadto, potencjał biomateriałów uzyskanych z jedwabiu pajęczego, takich jak hydrożele i filmy, może zostać wykorzystany przy projektowaniu systemów kontrolowanego, opóźnionego uwalniania leku [249, 250]. Podobnie mikrosfery i kapsułki poddane stosownym modyfikacjom mogą łączyć cechy systemu *dépot* oraz celowanego dostarczania leków do wybranych komórek organizmu [241].

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę stworzenia innowacyjnego systemu do rozpoznawania komórek nowotworowych w modelu eksperymentalnym dla celów

diagnostycznych i terapeutycznych. W tym celu skonstruowano nośniki (sfery) oparte na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym. Bioinżynierowany jedwab pajęczy jest funkcjonalizowany peptydami kierującymi do komórek nowotworowych. Stabilne nośniki (sfery) uzyskuje się w prostym procesie wysalania białek w obecności jonów fosforanowych. Lek ładowany jest podczas procesu formowania sfer. Po dostarczeniu do celu substancje aktywne są uwalniane, a jedwabne nośniki enzymatycznie degradowane. Skuteczność dostarczania leków za pomocą jedwabnych sfer analizowano w modelu raka piersi (i jajnika) charakteryzującym się nadekspresją receptora Her2. Do nośnika dołączono (na poziomie DNA) sekwencję nadającą funkcję rozpoznawania receptora Her2 na powierzchni komórek nowotworowych. Hybrydowe białka jedwabiu tworzące sfery i rozpoznające receptory komórkowe mają ogromny potencjał jako nośnik leków w celowanej terapii i diagnostyce nowotworów.

2. Założenia i cel pracy

Leki przeciwnowotworowe stosowane ogólnoustrojowo w dawkach terapeutycznych mogą powodować poważne działania niepożądane. Obecnie prowadzone są intensywne badania w celu dostarczenia leków bezpośrednio do komórek nowotworowych aby oszczędzić inne komórki w organizmie. Założeniem badań jest konstrukcja nośników dostarczających substancje aktywne z wykorzystaniem modelu Her2-dodatniego raka piersi. Nośnikami są sfery oparte na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym. Jedwab determinuje kształt, rozmiar, szybkość degradacji nośnika i czas uwalniania leku. Bioinżynierowany jedwab jest funkcjonalizowany peptydami zapewniającymi wiązanie sfer z odpowiednimi komórkami docelowymi.

Celem głównym rozprawy doktorskiej jest stworzenie biokompatybilnego i biodegradowalnego systemu dostarczania substancji czynnych do określonych komórek *in vivo* opartego na jedwabnych biomateriałach, przeznaczonego do celowanej terapii i diagnostyki nowotworów.

Cele szczegółowe zawarte w rozprawie doktorskiej obejmują:

- i. Konstrukcję wektorów ekspresyjnych.
- ii. Produkcję i oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.
- iii. Wytwarzanie i charakterystykę nośnika (sfery) opartego na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym.
- iv. Inkorporację doksorubicyny do jedwabnych sfer i opracowanie profilu uwalniania leku.
- v. Ocenę biologicznych oddziaływań funkcjonalizowanych jedwabnych sfer kierowanych do komórek *in vitro*.
- vi. Ocenę biologicznych interakcji jedwabnych sfer kierowanych do komórek *in vivo*.
- vii. Ocenę efektu terapeutycznego doksorubicyny dostarczanej w sferach do komórek *in vivo*.

3. Materiały i metody

3.1 Hodowle komórkowe

Linie komórkowe hodowano na płytkach Petriego o średnicy 10 cm (Sarstedt) w temp. 37 °C, w atmosferze 100% wilgotności, wzbogaconej 5% CO₂. Jako medium hodowlane stosowano pożywkę Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich) zawierającą 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS) (Sigma Aldrich). Ponadto, do medium dodawano antybiotyk gentamycynę (KRKA) w stężeniu 80 µg/ml.

Komórki pasażowano po uzyskaniu 90% konfluencji. W tym celu zbierano medium i komórki przemywano buforem fosforanowym PBS (Sigma Aldrich). Następnie komórki oddzielano od podłoża za pomocą 10% trypsyny (Gibco). Działanie trypsyny hamowano przez dodanie medium kompletnego. Pasaże komórek przeprowadzano w warunkach jałowych, w komorze z przepływem laminarnym. Żywotność komórek oceniano przy pomocy ekskluzji błękitu trypanu.

3.1.1 Ludzkie linie komórkowe

Stosowano dwie linie komórkowe charakteryzujące się nadekspresją Her2: SKBR3 i SKOV3. Linia SKBR3 to ludzkie komórki raka piersi wyizolowane z przerzutów do płucnej. Linia SKOV3 to komórki adherentne ludzkiego raka jajnika wyizolowane z płynu otrzewnej.

Kontrolę stanowiły komórki linii MSU1.1 zdrowych ludzkich fibroblastów bez ekspresji Her2, unieśmiertelnionych poprzez wprowadzenie genu *v-myc*.

3.1.2 Mysie linie komórkowe

Dwie mysie linie komórkowe: D2F2 i D2F2/E2 otrzymano od prof. C. Baxevanisa, (Ateny, Grecja). D2F2 to komórki mysiego raka komórkowego piersi wyprowadzone od samic myszy szczepu BALB/c. Komórki D2F2/E2 uzyskano poprzez stabilną transfekcję ludzkim receptorem Her2 [251]. Komórki D2F2/E2 do utrzymania ekspresji Her2 wymagają w medium antybiotyku selekcyjnego genetycyny (G-418, Sigma Aldrich) w stężeniu 200 µg/ml.

3.2 Przygotowanie mysich komórek D2F2 i D2F2/E2 zawierających gen lucyferazy

Komórki D2F2 modyfikowano wektorem pGL4.51 – Luc, z genem oporności na genetycyne (*gen*). Komórki D2F2/E2 modyfikowano wektorem pcDNA3.1(zeo-) – Luc, z genem oporności na zeocynę (*zeo*). Oba plazmidy zawierały gen lucyferazy (*luc*). Komórki transfekowano stosując Lipofectamine LTX, PLUS Reagent (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta oraz selekcję w celu uzyskania stabilnych klonów. Aktywność lucyferazy oceniano stosując Luciferase Assay System (Promega) według instrukcji producenta. Ocenę proliferacji D2F2/LUC i D2F2/E2/LUC przeprowadzano przy pomocy testu kolorymetrycznego MTT.

3.3 Ocena ekspresji genu Her2

Do pół-ilościowej oceny ekspresji Her2 w komórkach prawidłowych i nowotworowych użyto metody immunohistochemicznej. Komórki utrwalano w formalinie i procedowano do uzyskania preparatów na szkiełkach (Super Frost Plus). Reakcję przeprowadzano w zautomatyzowanym systemie barwiącym (Roche/Ventana BenchMark™) z anty-HER-2/*neu*(4B5) Ventana Pathway Kit (Roche/Ventana Medical Systems). Nasilenie zabarwienia błonowego określano stosując 4-stopniową skalę: brak zabarwienia (0-), zabarwienie słabe (1+), umiarkowane (2+) i silne (3+).

3.4 Konstrukcja plazmidów kodujących funkcjonalizowane białka jedwabiu pajęczego

Syntetyczne sekwencje H2.1 i H2.2 wklonowano do wektorów ekspresyjnych pETNX-MS1 i pETNX-MS2. Sekwencje kodujące domeny funkcyjne wprowadzano w miejsce restrykcyjne *NheI* w celu 5'-końcowej funkcjonalizacji konstruktów MS1 lub MS2 (pETNX-H2.1-MS1, pETNX-H2.2-MS1, pETNX-H2.1-MS2, pETNX-H2.2-MS2) lub w miejsce restrykcyjne *SpeI* w celu 3'-końcowej funkcjonalizacji konstruktów MS1 (pETNX-MS1-H2.1 i pETNX-MS1-H2.2). Sekwencje syntetycznych oligonukleotydów kodujących domeny H2.1 i H2.2 były następujące: H2.1F – 5'-CTAGCATGTATTGGGGCGATAGCCATTGGCTGCAGTATTGGTACGAAA, H2.1R – 5'-CTAGTTTCGTACCAATACTGCAGCCAATGGCTATCGCCCCAATACATG oraz

H2.2F – 5'-CTAGCCTGACCGTGAGCCCGTGGTATA, H2.2R – 5'-CTAGTATAACCACGGGCTCACGGTCAGG. Oligonukleotydy H2.1F/H2.1R i H2.2F/H2.2R poddawano annealingowi, w wyniku czego otrzymywano fragmenty dwuniciowego DNA z lepкими końcami komplementarnymi do tych generowanych przez *NheI* i *SpeI*.

Konstrukty pETNX-MS1 i pETNX-MS2 wytrawiano enzymami restrykcyjnymi *NheI* i *SpeI*. Następnie, w celu inaktywacji restryktaz mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 70 °C przez 10 minut. Po ochłodzeniu mieszaniny, plazmid będący w formie linearnej defosforylowano.

W następnym etapie wektor (pETNX-MS1 i pETNX-MS2) rozdzielano w 0,7% żelu agarozowym w obecności buforu 1x TAE i bromku etydyny ze znacznikiem masy DNA 1 kb. Następnie wycinano fragmenty żelu zawierające DNA wektora, które izolowano używając zestawu do ekstrakcji DNA z żelu (A&A Biotechnology). Kolejno ligowano insert (H2.1 i H2.2) do plazmidu pETNX-MS1 i pETNX-MS2 przez noc w temperaturze 16 °C. Jednocześnie przeprowadzano reakcję kontrolną, gdzie do mieszaniny reakcyjnej nie dodawano wstawki. Wszystkie odczynniki, jeśli nie zaznaczono inaczej, pochodziły z firmy Fermentas.

W celu namnożenia powstałego konstrukt transformowano kompetentne bakterie *E. coli* szczepu DH5 α (Invitrogen) według procedury zalecaniej przez producenta. Poprawność klonowania oceniano poprzez trawienie wyizolowanych plazmidów odpowiednią kombinacją enzymów restrykcyjnych w obecności buforu zalecanego przez producenta. Enzymami restrykcyjnymi *NdeI* i *XhoI* potwierdzano obecność insertu, natomiast orientację insertu sprawdzano przy użyciu enzymów *NheI* i *SpeI*. Sekwencje pozytywnych wektorów ekspresyjnych potwierdzano przez sekwencjonowanie wykonywane w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.5 Produkcja białek jedwabiu pajęczego

3.5.1 Przygotowanie bakterii BLR (DE3)

Do kompetentnych bakterii *E. coli* szczepu BLR (DE3) (Novagen) wprowadzano plazmidy ekspresyjne kodujące poszczególne warianty białek jedwabiu pajęczego (pETNX/MS1, pETNX/H2.1MS1, pETNX/MS1H2.1, pETNX/H2.2MS1, pETNX/MS1H2.2,

pETNX/MS2, pETNX/H2.1MS2 oraz pETNX/H2.2MS2) stosując transformację metodą termiczną. Poprawność transformacji sprawdzano poprzez mini-izolację plazmidowego DNA z wybranych kolonii, analizę restrykcyjną enzymami *NdeI* i *XhoI* oraz sekwencjonowanie.

3.5.2 Ekspresja białek jedwabiu pajęczego w dużej skali

Pojedyncze kolonie BLR(DE3) zawierające wektory ekspresyjne pobierano ze stałej pożywki LB, przenoszono do 3 ml płynnej pożywki LB zawierającej kanamycynę i tetracyklinę w stężeniu 50 µg/ml i inkubowano przez noc w 37 °C z wytrząsaniem. Następnie, 50 µl zawiesiny bakteryjnej przenoszono do 50 ml płynnej pożywki LB z antybiotykami (jak wyżej) i hodowlę bakteryjną kontynuowano w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem. Hodowla ta stanowiła inokulum do hodowli bakteryjnej w bioreaktorze.

Do produkcji białek jedwabiu pajęczego w dużej skali stosowano bioreaktor Bioflo 3000 (New Brunswick Scientific). Do końcowej objętości pożywki (4 litry) dodawano 38 ml zawiesiny bakteryjnej z całonocnej hodowli 50 ml. Komórki bakteryjne hodowano w pożywce z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (A&A Biotechnology) (20 g/l), glukozy (POCH) (10 g/l), medium R2 (w składzie: MgSO₄ (Sigma Aldrich) – 0,7 g/l, kwas cytrynowy (Sigma Aldrich) – 0,85 g/l, (NH₄)₂HPO₄ (POCH) – 2 g/l, KH₂PO₄ (POCH) – 6,75 g/l), roztworu pierwiastków śladowych oraz kanamycyny w stężeniu 50 µg/ml. pH utrzymywano na poziomie 6,8 poprzez dodawanie wody amoniakalnej (POCH). Stosowano poziom rozpuszczonego tlenu w ilości 40% dzięki automatycznej regulacji szybkości mieszania i dostarczaniu sprężonego powietrza. Komórki bakteryjne hodowano w temp. 37 °C do uzyskania określonej gęstości optycznej bakterii wyrażanej wartością OD przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀). Gdy wartość OD₆₀₀ wynosiła 9 – 11, do kultury bakteryjnej dodawano 1 mM IPTG (izopropyl-1- β -D-galaktopiranozyd) (A&A Biotechnology). Następnie, po 4-godzinnej inkubacji, komórki zbierano przez wirowanie przy 3500g.

3.6 Oczyszczanie białek jedwabiu pajęczego

Białka jedwabiu pajęczego oczyszczano metodą termicznej denaturacji o nazwie 80/20. Do osadu bakteryjnego dodawano bufor lizujący zawierający 20 mM HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy), pH 7,5 (Sigma Aldrich), 100 mM NaCl

(Sigma Aldrich), koktajl inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich) oraz lizozym (Thermo Scientific) w stężeniu 0,2 mg/ml. Następnie lizat bakteryjny sonikowano, dodawano $MgCl_2$ i DNazę I w stężeniu 0,1 mg/ml, a następnie po godzinnej inkubacji wirowano przy 50000 g przez 30 min. w temp. 4 °C. Białka bakteryjne strącano poprzez termiczną denaturację (80 °C przez 20 minut) i usuwano przez sedymentację przy 50000 g przez 30 min. w temp. 4 °C. Kolejno, białka jedwabiu pajęczego pozostające w supernatancie wytrącano 20% lub 25% siarczanem amonu (ICN Biomedicals Inc), odwirowywano przy 10000 g przez 15 min, płukano odpowiednio 20% lub 25% siarczanem amonu, a następnie rozpuszczano w 6 M tiocyjanianie guanidyny (ICN Biomedicals Inc). Otrzymane białka dializowano w 50 mM boranie sodu, pH 8.5 (Sigma Aldrich). Do dializy stosowano membrany dializacyjne o punkcie odcięcia masy molekularnej 12000 – 14000 Da (Carl Roth). Stężenie białka oznaczano metodą spektroskopii UV przy długości fali 280 nm jak opisano w sekcji 3.13.1. W celu jakościowej oceny przeprowadzano elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w 12,5% żelu poliakryloamidowym. Białka obecne w żelu wybarwiano błękitem koloidalnym Roti Blue (Carl Roth).

3.7 Przygotowanie kompleksów białka z fluorescencyjnymi kulkami

3.7.1 Przyłączenie białek do kulek fluorescencyjnych modyfikowanych grupami-COOH

Kompleksy białka-kulki fluorescencyjne przygotowano według zaleceń producenta poprzez kowalencyjne przyłączenie fluorescencyjnych kulek o wielkości 0,5 μm (o długości fali wzbudzenia/emisji 505/515 nm), modyfikowanych grupami karboksylowymi (Molecular Probes), do wolnych grup aminowych białek jedwabiu pajęczego (MS1H2.1, MS1H2.2). W reakcji stosowano następujące związki chemiczne: rozpuszczalny w wodzie 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid (EDC) (Sigma Aldrich) i imid kwasu N-hydroksybursztynowego (Sulfo-NHS) (Sigma Aldrich).

3.7.2 Przyłączenie białek do kulek fluorescencyjnych modyfikowanych grupami-NH₂

W celu przyłączenia białek jedwabiu pajęczego MS1, H2.1MS1, H2.2MS1 oraz herceptyny (przeciwciało anti-Her2) (Roche) do fluorescencyjnych kulek modyfikowanych grupami aminowymi, opisany przez producenta protokół zmodyfikowano.

Grupy karboksylowe występujące w dostępnych komercyjnie kulkach fluorescencyjnych zastępowano wolnymi grupami aminowymi w obecności 1,6-heksametylenodiaminy (HMDA) (Sigma Aldrich). W tym celu grupy –COOH prezentowane na kulkach fluorescencyjnych aktywowano w buforze MES, pH 6 z dodatkiem EDC i Sulfo-NHS jak opisano powyżej. Następnie, do mieszaniny reakcyjnej dodawano HMDA i kontynuowano inkubację przez 2 godz. w temp. pokojowej przy ciągłym mieszaniu. Kolejno, doprowadzano mieszaninę do pH 7,4 poprzez płukanie buforem fosforanowym o pH 7,4. Fluorescencyjne kulki modyfikowane grupami aminowymi przyłączano do białkowych grup karboksylowych. Równocześnie aktywowano grupy karboksylowe białek w obecności EDC i Sulfo-NHS jak opisano powyżej. Następnie, białka oddzielano od składników reakcji poprzez oczyszczanie na kolumnie PD-10 (GE Healthcare). Roztwór białek z aktywowaną grupą karboksylową inkubowano przez 2 godz. w temp. pokojowej z zawiesiną kulek posiadających podstawiane grupy aminowe. Następnie reakcję zatrzymywano, przepłukiwano, a otrzymane kompleksy zawieszano w buforze do przechowywania.

3.8 Znakowanie białek jedwabiu znacznikami fluorescencyjnymi

W celu oceny wiązania sfer metodami mikroskopowymi i cytometrycznymi, białka jedwabiu pajęczego znakowano kowalencyjnie fluoroforami z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów, postępując zgodnie z instrukcjami producenta. Białka sprzęgano z fluoroforem FITC (o długości fali wzbudzenia/emisji 495/525 nm) przy użyciu FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (Sigma Aldrich). Koniugację fluoroforu ATTO 647N (o długości fali wzbudzenia/emisji 647/661 nm) do białek jedwabiu przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu ATTO 647N Protein Labeling Kit (Sigma Aldrich).

3.9 Wytwarzanie jedwabnych sfer

Jedwabne sfery wytwarzano przez wysalanie roztworu białek jedwabiu pajęczego indukowane jonami fosforanu potasu. Roztwór białka w stężeniu 0,5 mg/ml mieszano z 2 M fosforanem potasu (K_3PO_4), pH 8 (Sigma Aldrich) w stosunku objętościowym 1: 10 (100 μ l: 1000 μ l) przy użyciu pipety. Otrzymane jedwabne sfery inkubowano w temp. pokojowej przez 12 godz. Zawiesinę sfer w K_3PO_4 przenoszono do membrany dializacyjnej i dializowano do wody destylowanej przez 24 godz., z kilkukrotną wymianą wody. Następnie, sfery wirowano przy 10000 g przez 5 min. i zawieszano w ultra-czystej wodzie (Sigma Aldrich). Do testów wiązania komórek, wytwarzano sfery z wykorzystaniem białka jedwabiu pajęczego uprzednio wyznakowanego fluoroforem ATTO 647N lub FITC, jak opisano w punkcie 3.8. Ilość sfer określano grawimetrycznie.

3.10 Potencjał dzeta jedwabnych sfer

Potencjał dzeta analizowano przy użyciu urządzenia Zetasizer Nano XS (Malvern Instruments Ltd). Zawiesinę sfer bezpośrednio przed pomiarem potencjału dzeta sonikowano przez 5 min. w ultradźwiękowej łaźni wodnej (Polsonic). Eksperyment przeprowadzano trzy razy w trzech powtórzeniach w 25 °C.

3.11 Inkorporacja doksorubicyny do sfer

Inkorporację leku modelowego doksorubicyny (Dox) (Adriamycin, Pfizer Inc) przeprowadzano dwoma metodami: (i) ładowanie w trakcie wytwarzania sfer, oraz (ii) ładowanie po wytworzeniu sfer.

Do ładowania Dox w trakcie wytwarzania sfer 100 μ l roztworu zawierającego białko jedwabiu w stężeniu 0,5 mg/ml i Dox w stężeniu 1 mg/ml mieszano z 1000 μ l 2 M K_3PO_4 , pH 8,0 (w stosunku objętościowym 1: 10). Po 12 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej, sfery dializowano do wody, a następnie wirowano przez 5 min. przy 10000 g. Ilość sfer oznaczano grawimetrycznie. Następnie, sfery rozpuszczano w 6 M izotiocyanianie guanidyny, a stężenie Dox oznaczano w roztworze za pomocą spektrofluorometru jak opisano

w sekcji 3.14. Do ilościowego oznaczenia leku zawartego w roztworze po rozpuszczeniu sfer wyznaczano wzorcową krzywą kalibracji.

W celu inkorporacji Dox po wytworzeniu sfer stosowano następujący protokół: 50 μg jedwabnych sfer mieszano z 100 μg Dox (50 μl roztworu wodnego w stężeniu 2 mg/ml) i zawieszano w PBS o pH 7,4 do objętości końcowej 300 μl . Następnie zawiesinę inkubowano w temperaturze pokojowej przy ciągłym wytrząsaniu. Po 12 godz. inkubacji sfery wirowano, a stężenie leku oznaczono spektrofotometrycznie (sekcja 3.13.2). Do ilościowego oznaczenia leku pozostającego w supernatancie wyznaczano wzorcową krzywą kalibracji. Całkowitą ilość leku ładowanego do jedwabnych sfer obliczano przez odjęcie ilości leku pozostającego w supernatancie od wyjściowej ilości leku.

W przypadku obu metod korzystano z następującego równania: Ładowanie = (ilość Dox w próbce)/(ilość próbki). Ilość inkorporowanego leku przedstawiano jako ng Dox/ μg sfer.

3.12 Uwalnianie doksorubicyny ze sfer

Jedwabne sfery ładowane Dox zawieszano w 1 ml buforu fosforanowego o pH 4,5, 6 lub 7,4 i inkubowano w temp. 37 °C z ciągłym wytrząsaniem. W określonych punktach czasowych zbierano bufor znad poszczególnych próbek i zastępowano świeżym PBS o odpowiednim pH. Stężenie Dox w pobranej frakcji oznaczano przez pomiar absorbancji (jak opisano w sekcji 3.13.2) lub fluorescencji (sekcja 3.14). Do ilościowego oznaczenia leku stosowano krzywą wzorcową. Całkowitą ilość leku uwalnianego ze sfer opisywano względem czasu.

3.13 Metody spektrofotometryczne

3.13.1 Stężenie białka

Stężenie białek oznaczano metodą spektroskopii UV przy 280 nm przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Stosowano następujące współczynniki ekstynkcji: 22350 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 43320 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 43320 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 29340 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i 29340 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dla białek jedwabiu pajęczego MS1, H2.1MS1, MS1H2.1, H2.2MS1 i MS1H2.2,

odpowiednio oraz $44700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $65670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $51690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dla białek MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2, odpowiednio.

3.13.2 Mętność sfer w roztworze

Stabilność sfer mierzono pośrednio w oparciu o pomiary spektrofotometryczne mętności sfer w roztworze przy długości fali 700 nm. Analizowano zmętnienie roztworów jedwabnych sfer przed i po dializie. Pomiary wykonywano przy użyciu spektrofotometru Ultrospec 2000 UV-Vis (Pharmacia Biotech). Stabilność przedstawiano jako % kontroli (w stosunku do próby przed dializą).

3.13.3 Ładowanie i uwalnianie Dox

Pomiary spektrofotometryczne wykonywano w celu określenia ilości inkorporowanej oraz uwalnianej ze sfer doksorubicyny (Dox). Absorbancję Dox mierzono przy długości fali 509 nm przy użyciu spektrofotometru Ultrospec 2000 UV-Vis (Pharmacia Biotech).

3.14 Metody spektrofluorometryczne

Stężenie Dox oznaczano przez pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 480 nm i długości fali emisji 590 nm. Fluorescencję Dox analizowano przy użyciu wielomodalnego czytnika mikroplątek Victor X3 (Perkin Elmer) kontrolowanego przez oprogramowanie Perkin Elmer 2030 Workstation.

3.15 Metody mikroskopowe

3.15.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Jedwabne sfery w zawiesinie wodnej nanoszono na szkiełko nakrywkowe (Nunc) i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie, próbki napyłano złotem w atmosferze próżni przy użyciu napyłarki Quorum Sputter Coater Q150T ES (Quorum Technologies). Próbki analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JEOL JSM-7001F (Jeol) z zastosowaniem napięcia 10 kV. Wielkości analizowanych sfer określano przy pomocy oprogramowania ImageJ 1.46r.

3.15.2 Mikroskopia fluorescencyjna

Komórki SKBR3, SKOV3 i MSU1.1 wysiewano na płytkę 24-dołkową w ilości 100 tys. komórek/dołek i hodowano przez 24 godz. Bezpośrednio przed eksperymentem zawiesinę kompleksów białko-kulki fluorescencyjne sonikowano, a następnie dodawano do kompletnego medium i inkubowano z komórkami przez 4 godz. w temp. 37 °C. Komórki płukano PBS, a jądra komórkowe wybarwiano 4',6-diamidynodihydrochloranem-2-fenylindonu (DAPI) w stężeniu 5 µg/ml (Sigma Aldrich). Po 30 min. komórki ponownie płukano, dodawano świeżą pożywkę i próby analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI3000 B (Leica). Obserwację mikroskopową i analizę obrazu przeprowadzano przy użyciu obiektywu z powiększeniem 20x i oprogramowania Leica Application Suite (LAS). Jądra wizualizowano stosując filtry o długości fali wzbudzenia 340-380 nm i emisji 425 nm. Fluorescencyjne kulki obserwowano stosując filtry wzbudzenia 470-490 nm i emisji 515 nm.

3.15.3 Mikroskopia konfokalna

Za pomocą konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM) Leica TCS SP5 X (Leica) połączonego z białym laserem obrazowano jedwabne sfery znakowane ATTO 647N oraz sfery załadowane Dox. Sfery w zawieszynie wodnej analizowano stosując powiększenie 100x i obiektyw immersyjny 1,4 NA. CLSM kontrolowano przez oprogramowanie LAS AF. Dla znakowanych fluorescencyjnie sfer (ATTO 647N) stosowano długość fali wzbudzenia 647 nm i długość fali emisji 661 nm, natomiast sfery ładowane Dox obrazowano przy długości fali wzbudzenia 488 nm i długości fali emisji 590 nm.

Za pomocą CLSM oceniano wiązanie funkcjonalizowanych jedwabnych sfer do komórek. W tym celu wykorzystywano do produkcji sfer białka znakowane fluoroforem ATTO 647N. Komórki w ilości 50 tys./dołek wysiewano 48 godz. przed rozpoczęciem eksperymentu wiązania na 8-dołkowe komory Lab-Tek (Nunc). 1 µl jedwabnych sfer znakowanych ATTO 647N (w stężeniu 10 µg/ml) dodawano do komórek i inkubowano przez 4 godz. w temp. 37 °C. Komórki płukano następnie PBS, a błony komórkowe barwiono konkanawaliną A skoniugowaną z FITC (Con A-FITC) (Sigma Aldrich) w stężeniu 50 µg/ml. Po 30 min. inkubacji komórki płukano, utrwalano 4% paraformaldehydem (PFA) (Sigma Aldrich), a następnie zawieszano w PBS i analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Sfery wizualizowano jak opisano powyżej, a do obrazowania błon komórkowych stosowano

długości fali wzbudzenia/emisji 488/525 nm. Używano immersyjnego obiektywu 1.4 N.A. z powiększeniem 100x.

W przypadku, gdy jądra komórkowe wybarwiano DAPI, próby analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Olympus FV1000 (Shinjuku), połączonego z laserem diodowym 405 nm oraz laserem argonowym. W tym celu komórki SKBR3 wysiewano na 10-dolkowe szkiełka (MP Biomedicals) w ilości 20 tys. komórek/dolek. Po 24 godz., 1 μ l sfer znakowanych ATTO 647N lub sfer ładowanych Dox (w stężeniu 10 μ g/ml) dodawano do kompletnej pożywki hodowlanej i inkubowano z komórkami w temp. 37 °C. Po 4 godz. inkubacji komórki płukano PBS i utrwalano 4% PFA. Na szkiełka następnie nakraplano medium utrwalające z DAPI (Sigma Aldrich). Obrazowanie przeprowadzano z wykorzystaniem obiektywu immersyjnego 1,4 NA z powiększeniem 60x i oprogramowania Fluoview Viewer ver. 4.1. Jądra wizualizowano przy długości fali wzbudzenia/emisji 405/440-480 nm. Jedwabne sfery obserwowano stosując wzbudzenie 635 nm i zasięg długości fali emisji 575-675 nm. Do wizualizacji błon komórkowych stosowano długości fali wzbudzenia/emisji 488/495-525 nm. Przy pomocy mikroskopu FV1000 wykonywano także ocenę dystrybucji sfer ładowanych Dox *in vitro*. W celu wizualizacji Dox stosowano długości fali wzbudzenia/emisji 488/575-620 nm.

3.16 Cytometria przepływowa

Po uzyskaniu pożądanego konfluencji hodowli, komórki oddzielano od podłoża przy pomocy nieenzymatycznego odczynnika Cell Dissociation Solution (Sigma Aldrich). Do komórek (100 tys.) dodawano sfer znakowanych FITC w końcowym stężeniu 10 μ g/ml. Następnie próby inkubowano 1 godz. w temp. 4 °C, chroniąc przed dostępem światła. Próby analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto (BD Biosciences) obsługiwane oprogramowaniem FACSDiva (BD Biosciences). Fluorescencję białek jedwabiu pajęczego mierzono przy długości fali wzbudzenia 488 nm i długości fali emisji 525 nm.

3.17 Test cytotoksyczności MTT

Komórki SKBR3, SKOV3 i MSU1.1 wysiewano na płytki 96-dołkowe (Sarstedt) w ilości 25 tysięcy komórek/dołek. Po upływie 24 godz. z nadkomórek zbierano medium i dodawano funkcjonalizowane i kontrolne sfery z jedwabiu pajęczego, jedwabne sfery ładowane doksorubicyną oraz wolną doksorubicynę w różnych stężeniach. Komórki inkubowano z badanym związkiem lub sferami przez 4 godz., a następnie dwukrotnie przemywano PBS i zawieszano w kompletnym medium na kolejne 72 godziny, po czym wykonywano test MTT. Absorbancję mierzono stosując czytnik płytek Elx-800 (BioTek) przy długości fali 570 nm. Żywotność komórek (%) liczono wobec kontroli negatywnej wg równania: próbka badana/ kontrola negatywna x 100%. Eksperyment wykonywano trzy razy w trzech powtórzeniach.

3.18 Obrazowanie molekularne

Bioluminescencję, jak i fluorescencję *in vivo* analizowano za pomocą aparatu IVIS[®] Spectrum (Xenogen). Obserwowano bioluminescencję powstałą w wyniku reakcji utleniania związku lucyferyny przez enzym – lucyferazę. W celu monitorowania zmian w obrębie guzów, w 0, 10 i 20 dniu eksperymentu myszom podawano dootrzewnowo 200 µl lucyferyny/mysz (StayBrite, Biovision) rozpuszczonej w PBS (15 mg/ml), po czym zwierzęta usypiano za pomocą płynu wziewnego do znieczulenia ogólnego Forane[®] Isofluranum (Abbott) przy pomocy systemu do gazowej anestezji XGI 8 (Xenogen). Obrazowanie wykonywano stosując następujące parametry urządzenia wpływające na czułość detekcji: czas ekspozycji – 10 sekund, binning – small, F/stop – 1.

Biodystrybucję jedwabnych sfer oceniano na podstawie fluorescencji sfer przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm. Obrazowanie wykonywano każdorazowo 10 min., 24 godz. i 48 godz. po podaniu sfer. W celu oceny fluorescencji stosowano następujące ustawienia: czas ekspozycji – 10 sekund, binning – small, F/stop – 8.

3.19 Model mysich nowotworów piersi BALB/c

Komórki D2F2/LUC i D2F2/E2/LUC zawieszono w buforze PBS (10 mln/ml) wszczepiano podskórnym myszom BALB/c w ilości 1 mln/mysz. Po upływie 14 dni, oceniano rozwój guzów z wykorzystaniem urządzenia IVIS[®] Spectrum (Xenogen) oraz poprzez pomiar wielkości guzów suwmiarką. Eksperyment, od momentu osiągnięcia objętości guzów 50-100 mm³ (dzień 0 – rozpoczęcie podawania sfer lub Dox), prowadzono przez okres 20 dni. Myszy D2F2/E2/LUC (13 sztuk) dzielono na cztery grupy: (i) kontrolną otrzymującą dożylnie PBS (n=3), (ii) otrzymującą dożylnie wolną Dox (5 mg/kg m.c.) (n=3), (iii) otrzymującą doguzowo znakowane fluorescencyjnie sfery H2.1MS1 ładowane Dox (5 mg/kg m.c.) (n=3) oraz (iv) otrzymującą dożylnie znakowane fluorescencyjnie sfery H2.1MS1 ładowane Dox (5 mg/kg m.c.) (n=4). Myszy D2F2/LUC (11 sztuk) przyporządkowano do czterech grup jak opisano powyżej. Różnice polegały na liczebności grup: (i) n=2, (ii) n=3, (iii) n=3 oraz (iv) n=3. Badane czynniki podawano 3-krotnie w 0, 3 i 6 dniu eksperymentu. Każdorazowo po iniekcji oceniano dystrybucję i poziom akumulacji w guzie wykorzystując fluorescencję sfer. Ponadto, co drugi dzień za pomocą suwmiarki mierzono wzrost objętości guzów oraz oceniano masę ciała myszy. Objętość guzów obliczano na podstawie wzoru: $V=L \times W^2/2$, gdzie V – objętość guza, L – średnia długość, W – średnia szerokość.

3.20 Badanie histopatologiczne

W 20 dniu eksperymentu myszy poddawano terminacji przy pomocy systemu do gazowej eutanazji zwierząt laboratoryjnych (TEM-SEGA). Następnie, wszystkim badanym osobnikom wycinano guzy oraz narządy, które utrwalano w formalinie. Utrwalone guzy, serca, płuca, nerki oraz wątroby zatapiano w blokach parafinowych, cięto na skrawki, wybarwiano hematoksyliną i eozyną, a zmiany oceniano mikroskopowo.

3.21 Analiza statystyczna

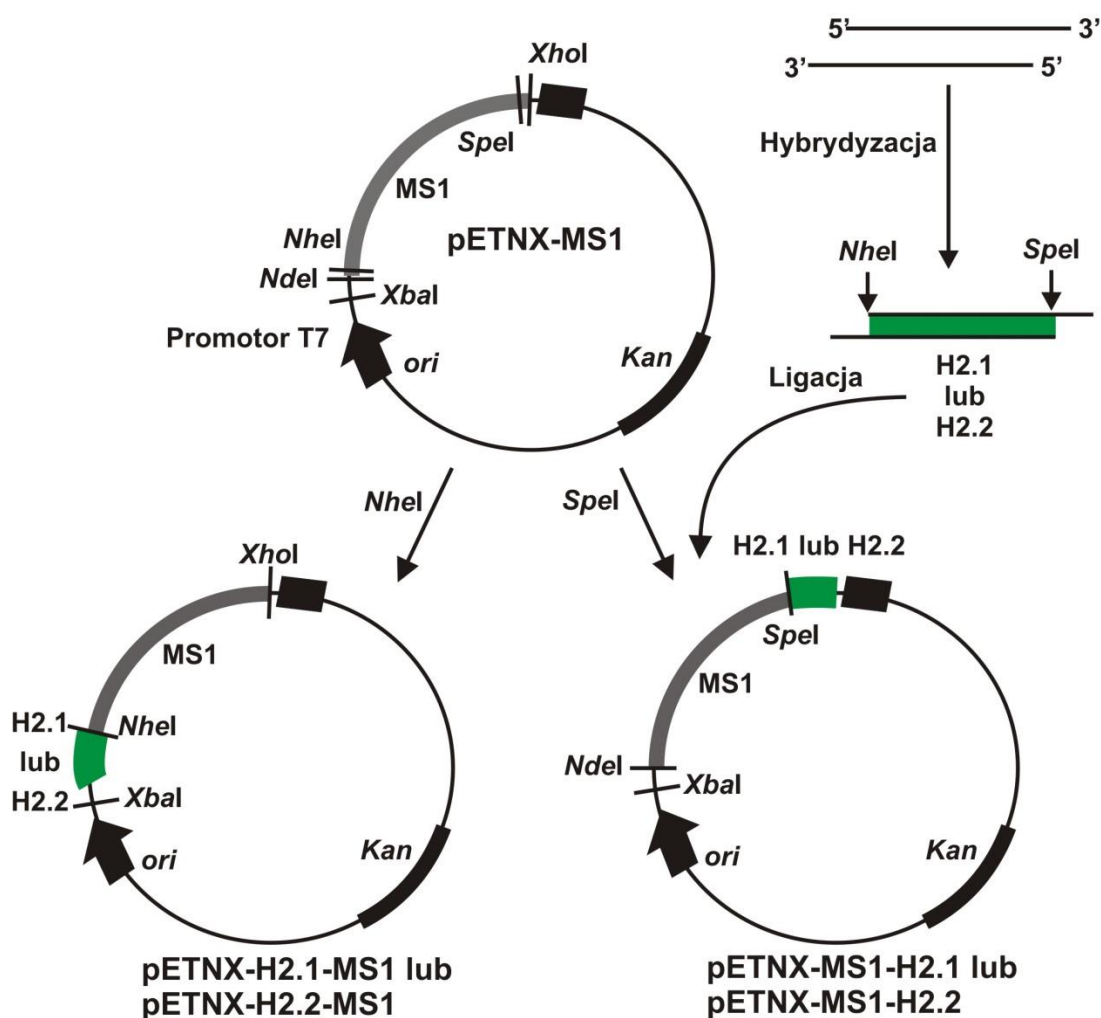
Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad v.5.0. Wyniki wyrażano jako średnią (\pm SD) pomiarów z przynajmniej trzech powtórzeń. Do określenia istotności statystycznej między grupami badanymi *in vitro*

stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA) lub dwustronny test wariancji (two-way ANOVA). Ponadto, w przypadku istotności statystycznej ANOVA ($p < 0,05$), wszystkie wyniki analizowano testem Bonferroni post-hoc. Różnice między próbami uznano za statystycznie istotne na poziomie istotności: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4. Wyniki

4.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych MS1

Przygotowano wektory ekspresyjne z poszczególnymi wariantami sekwencji kodującymi bioinżynierowane białko jedwabnego 15meru (MS1, zawierające 15 powtórzeń sekwencji konsensusowej białka MaSp1 od pająka *N. clavipes*) oraz białka hybrydowe (MS1 z domenami rozpoznającymi receptor Her2). Uzyskano plazmid pETNX-MS1 z H2.1 i H2.2 odpowiednio w miejscach restrykcyjnych *NheI* lub *SpeI* (Ryc.11).

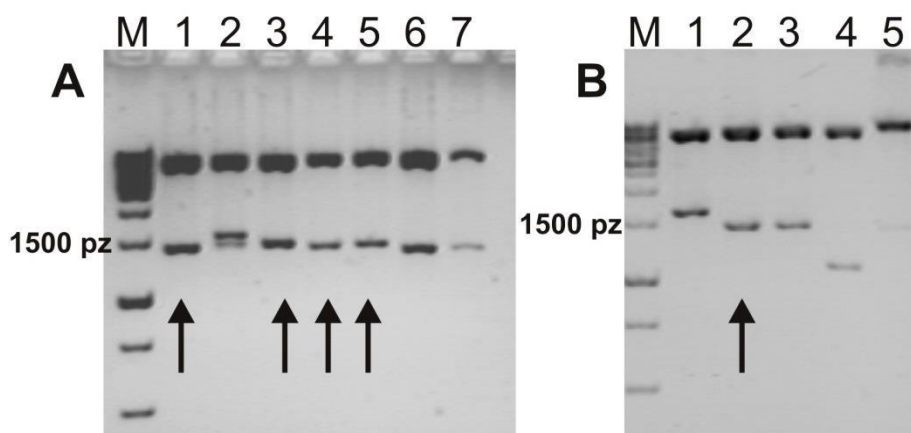


Ryc. 11 Schemat konstrukcji wektorów ekspresyjnych pETNX-MS1 z wklonowaną wstawką (H2.1 lub H2.2) na 5'-końcu lub 3'-końcu sekwencji jedwabiu (MS1).

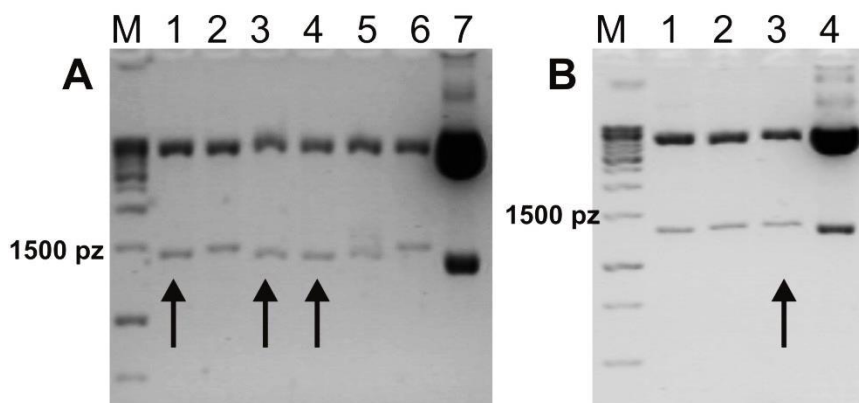
Tabela 3. Przewidywane fragmenty DNA otrzymane w wyniku analizy restrykcyjnej wektorów ekspresyjnych.

Wektor	Enzymy restrykcyjne	Długości fragmentów restrykcyjnych
pETNX-H2.1-MS1	<i>NdeI/XhoI</i>	5233 + 1545 pz
pETNX-MS1-H2.1	<i>NheI/SpeI</i>	5251 + 1527 pz
pETNX-H2.2-MS1	<i>NdeI/XhoI</i>	5233 + 1533 pz
pETNX-MS1-H2.2	<i>NheI/SpeI</i>	5251 + 1515 pz

Poprawność klonowania potwierdzono w analizie restrykcyjnej (Ryc. 12, Ryc.13 oraz Ryc. 14). Otrzymane długości DNA wykazały zgodność z długościami obliczonymi na podstawie mapy plazmidu (Tab. 3 i Ryc. 11) dla klonu nr 2 pETNX-H2.1-MS1 oraz klonu nr 3 pETNX-MS1-H2.1, co potwierdzono przez sekwencjonowanie.

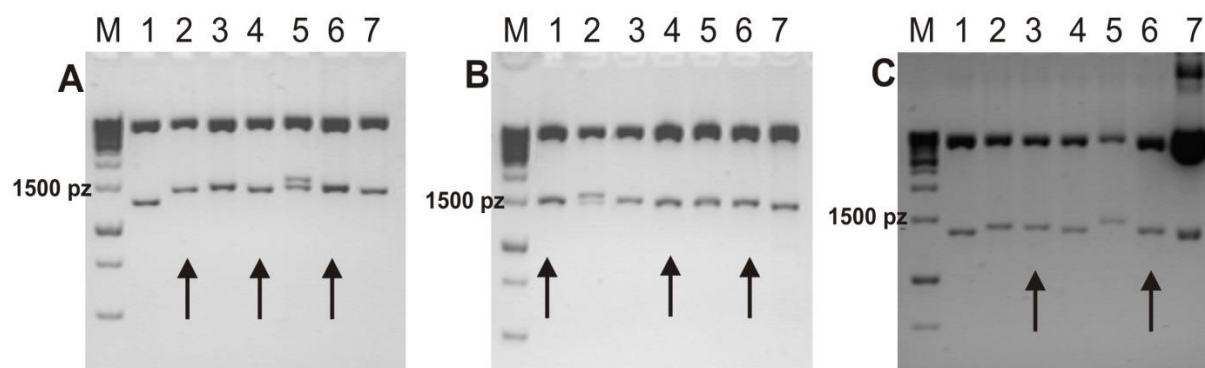


Ryc. 12 Rozdział elektroforetyczny plazmidów ekspresyjnych pETNX-H2.1-MS1 po trawieniu restrykcyjnym enzymami *NdeI/XhoI* (A) lub *NheI/SpeI* (B). Strzałki wskazują klony z wprowadzoną wstawką (A) lub pozytywne klony z wstawką w poprawnej orientacji (B). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 7 (A) i ścieżka 5 (B) przedstawiają wytrawiony kontrolny plazmid pETNX-MS1.



Ryc. 13 Rozdział elektroforetyczny plazmidów ekspresyjnych pETNX-MS1-H2.1 po trawieniu restrykcyjnym enzymami *NdeI/XhoI* (A) oraz *NheI/SpeI* (B). Strzałki wskazują klony z wprowadzoną wstawką (A) lub pozytywne klony z wstawką w poprawnej orientacji (B). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 7 (A) i ścieżka 4 (B) przedstawiają wytrawiony kontrolny plazmid pETNX-MS1.

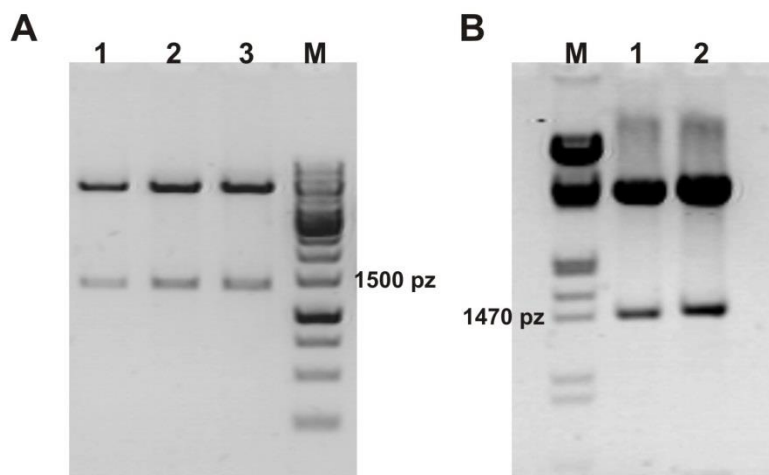
Rycina 14. przedstawia rozdział elektroforetyczny plazmidów pETNX-H2.2-MS1 (Ryc. 14 A, C) i pETNX-MS1-H2.2 (Ryc. 14 B, C) po trawieniu restrykcyjnym. Plazmid pETNX-H2.2-MS1 wyizolowany z klonu nr 3 oraz plazmid pETNX-MS1-H2.2 wyizolowany z klonu nr 6 posiadają poprawnie wprowadzoną wstawkę do wektora, co potwierdzono przez sekwencjonowanie.



Ryc. 14 Rozdział elektroforetyczny plazmidów ekspresyjnych pETNX-H2.2-MS1 (A, C) i pETNX-MS1-H2.2 (B, C) po trawieniu restrykcyjnym enzymami *NdeI/XhoI* (A, B) oraz *NheI/SpeI* (C). Strzałki wskazują klony z wprowadzoną wstawką (A) oraz pozytywne klony z wstawką w poprawnej orientacji (C – ścieżka 3 dla plazmidu pETNX-H2.2-MS1 oraz ścieżka 6 dla plazmidu pETNX-MS1-H2.2). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 7 (A, B, C) przedstawiają wytrawiony kontrolny plazmid pETNX-MS1.

4.2 Produkcja białka jedwabiu pajęczego MS1 i jego funkcjonalizowanych wariantów

Plazmidy kodujące poszczególne warianty białek jedwabiu pajęczego pETNX-MS1, pETNX-H2.1-MS1, pETNX-MS1-H2.1, pETNX-H2.2-MS1 i pETNX-MS1-H2.2 wprowadzono do bakterii BLR (DE3) na drodze termicznej transformacji, a brak rearanżacji genetycznej potwierdzono poprzez analizę restrykcyjną wyizolowanych plazmidów (Rys. 15 A, B).



Ryc. 15 Rozdział elektroforetyczny plazmidów trawionych enzymami *NdeI/XhoI*, wyizolowanych z bakterii ekspresyjnych BLR (DE3). (A) ścieżka 1 – plazmid pETNX-H2.1-MS1; ścieżka 2 – plazmid pETNX-MS1-H2.1; ścieżka 3 – plazmid pETNX-MS1; (B) ścieżka 1 – plazmid pETNX-H2.2-MS1; ścieżka 2 – plazmid pETNX-MS1-H2.2. M – marker masy DNA.

Uzyskano bioinżynierowane białko jedwabnego 15meru MS1 oraz białka hybrydowe (MS1 z domenami rozpoznającymi receptor Her2) w bakteryjnym systemie ekspresyjnym.

Ryc. 16 przedstawia sekwencje aminokwasowe pięciu wariantów bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego: (i) H2.1MS1 i MS1H2.1 z dołączoną domeną wiążącą Her2 – H2.1 o sekwencji MYWGDSHWLQYWYE [252], (ii) H2.2MS1 i MS1H2.2 z przyłączoną domeną wiążącą Her2 o nazwie H2.2 i sekwencji LTVSPWY [253] oraz (iii) kontrolne białko MS1 bez domeny funkcyjnej.

MS1

MAS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGTS)₁₅

H2.1MS1

MASMYWGDSHWLQYWYETS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGTS)₁₅

MS1H2.1

MAS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGTS)₁₅MYWGDSHWLQYWYETS

H2.2MS1

MASLTVSPWYTS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAQGGYGGLGSQGTS)₁₅

MS1H2.2

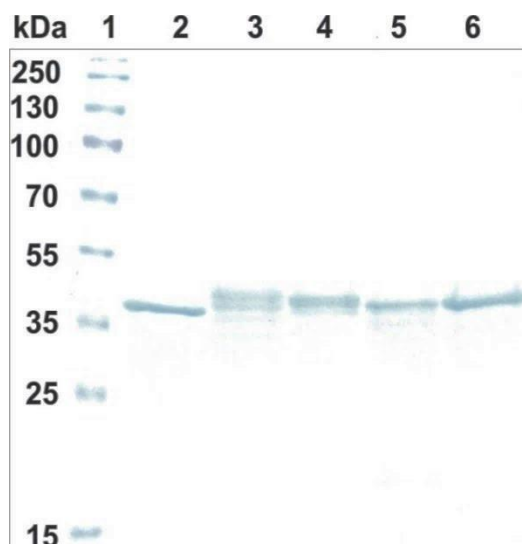
MAS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGTS)₁₅LTVSPWYTS

Ryc. 16 Sekwencje aminokwasów bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego (MS1) i białek funkcjonalizowanych peptydami wiążącymi Her2. Sekwencje domen funkcyjnych H2.1 i H2.2 zaznaczono kursywą, konsensusową sekwencję jedwabiu podkreślono.

Wydajność ekspresji zależała od wariantu białka jedwabiu. Otrzymano w przybliżeniu 50 g mokrego peletu bakteryjnego MS1 na 1 litr hodowli oraz około 40 g mokrego osadu bakteryjnego dla białek funkcjonalizowanych.

4.3 Oczyszczanie białek MS1

Rekombinowane białka jedwabiu pajęczego oczyszczono metodą termicznej denaturacji 80/20 [200, 224]. Wydajność oczyszczania poszczególnych jedwabi różniła się w zależności od białka i wynosiła odpowiednio: dla MS1 – 45,8 mg/l, H2.1MS1 – 22 mg/l, MS1H2.1 – 6,375 mg/l, H2.2MS1 – 4,25 mg/l oraz MS1H2.2 – 3,85 mg/l. Wydajność metody wyrażono jako ilość oczyszczonego białka na litr pożywki hodowlanej. W celu oceny jakościowej przeprowadzono analizę białka w 12,5% żelu SDS-PAGE. Białka MS1, H2.1MS1, MS1H2.1, H2.2MS1 i MS1H2.2 migrowały w żelu pomiędzy prążkami markera białkowego o masie 35 a 55 kDa. Obserwowane masy cząsteczkowe białek jedwabiu były zgodne z oczekiwanymi wartościami (Ryc. 17).

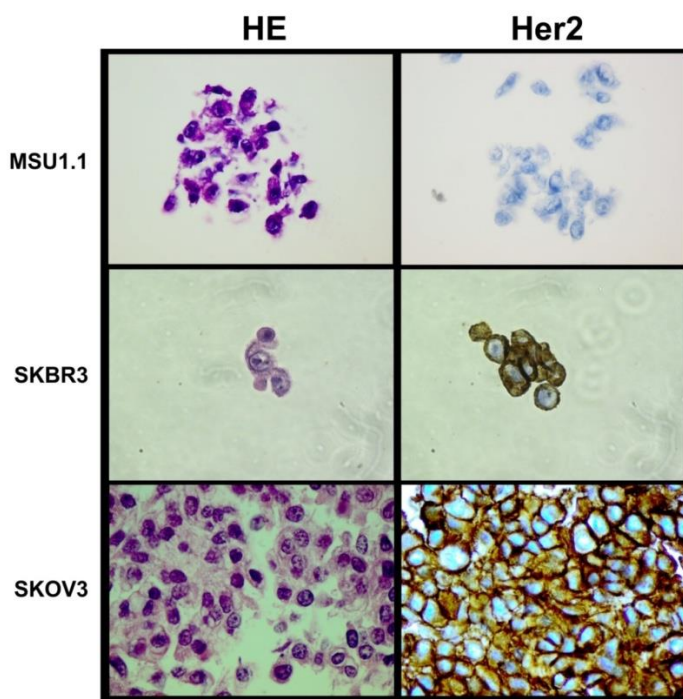


Ryc. 17 Rozdział elektroforetyczny rekombinowanych białek jedwabiu pajęczego w 12,5% żelu SDS-PAGE wybarwionych błękitem koloidalnym po oczyszczeniu metodą 80/20. 1 – marker masy białek Page Ruler (Fermentas), 2 – MS1, 3 – H2.1MS1, 4 – MS1H2.1, 5 – H2.2MS1, 6 – MS1H2.2.

4.4 Ocena swoistości wiązania funkcjonalizowanych białek

4.4.1 Immunohistochemiczna charakterystyka komórek

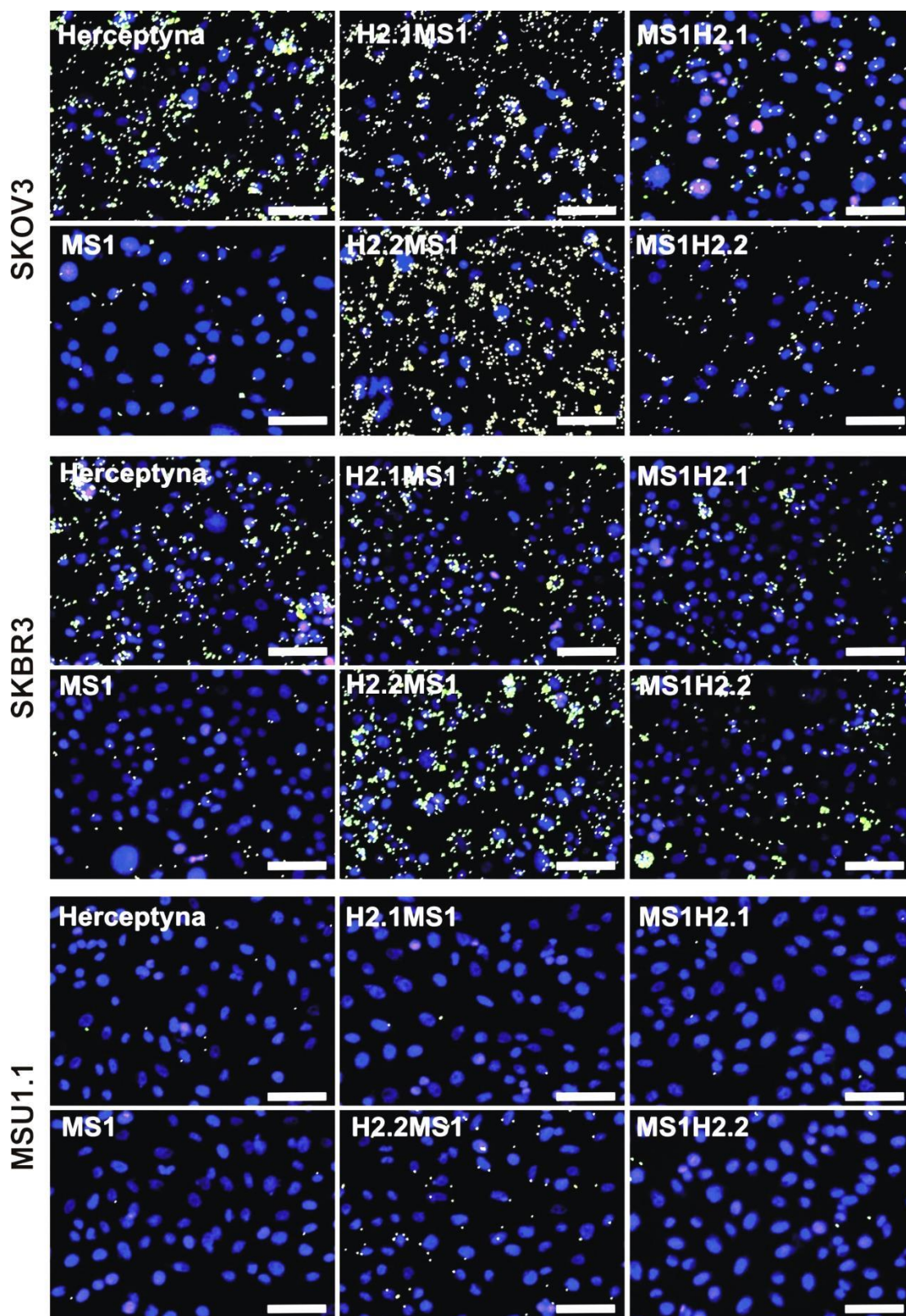
Badanie immunohistochemiczne wykonano w celu oceny ekspresji antygenu c-erbB-2 (Her2) w komórkach prawidłowych i nowotworowych z zastosowaniem króliczego przeciwciała monoklonalnego HER-2/neu(4B5). W liniach ludzkich komórek nowotworowych SKOV3 i SKBR3 wykazano nadekspresję białka Her2 (Ryc. 18). W reakcji immunohistochemicznej stwierdzono zabarwienie błony komórek z nadekspresją Her2, reakcji błonowej towarzyszyła reakcja cytoplazmatyczna. Poziom ekspresji Her2 w obu liniach oceniono na poziomie (3+). W błonie ludzkich komórek prawidłowych MSU1.1 nie stwierdzono ekspresji Her2 (Ryc. 18).



Ryc. 18 Analiza obecności receptora Her2 na powierzchni komórek. Reakcja immunohistochemiczna z zastosowaniem HER-2/neu(4B5) Ventana PATHWAY[®] powoduje zabarwienie błony komórek SKOV3 i SKBR3 (Her2 dodatni/3+) i brak zabarwienia komórek MSU1.1 (Her2 ujemny/0-). Kontrolnie komórki wybarwiono H+E.

4.4.2 Analiza *in vitro* wiązania kompleksów jedwab–kulki fluorescencyjne do komórek

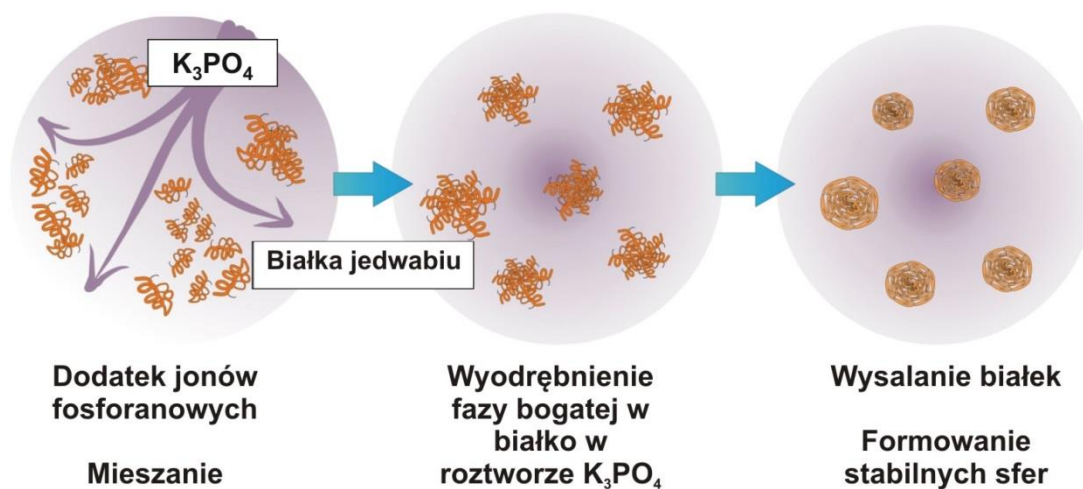
Funkcjonalizowane jedwabne kompleksy wykazały znacząco wyższe wiązanie do Her2-dodatnich komórek w porównaniu z komórkami Her2-ujemnymi (Ryc. 19). Ponadto wykazano, że funkcjonalizacja białka na N-końcu sekwencji jedwabiu (H2.1MS1 i H2.2MS1) powoduje znacznie wyższe wiązanie w porównaniu z białkami funkcjonalizowanymi na C-końcu (MS1H2.1, MS1H2.2). Wiązanie przeciwciała anty-Her2 (herceptyna) sprzężonego z kulkami fluorescencyjnymi (kontrola pozytywna) potwierdziło nadekspresję receptora Her2 w komórkach SKOV3 i SKBR3 (Ryc. 19).



Ryc. 19 Test wiązania kompleksów jedwabiu z fluorescencyjnymi kulkami do komórek z nadekspresją Her2 – SKOV3 i SKBR3 oraz Her2-ujemnych komórek kontrolnych MSU1.1. Wydajność wiązania jedwabiu kontrolnego (MS1) i jego funkcjonalizowanych wariantów analizowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Zielony – kompleksy jedwab–kulka fluorescencyjna lub herceptyna–kulka fluorescencyjna; niebieski – jądra komórkowe wybarwione DAPI. Skala: 50 μm .

4.5 Wytwarzanie jedwabnych sfer

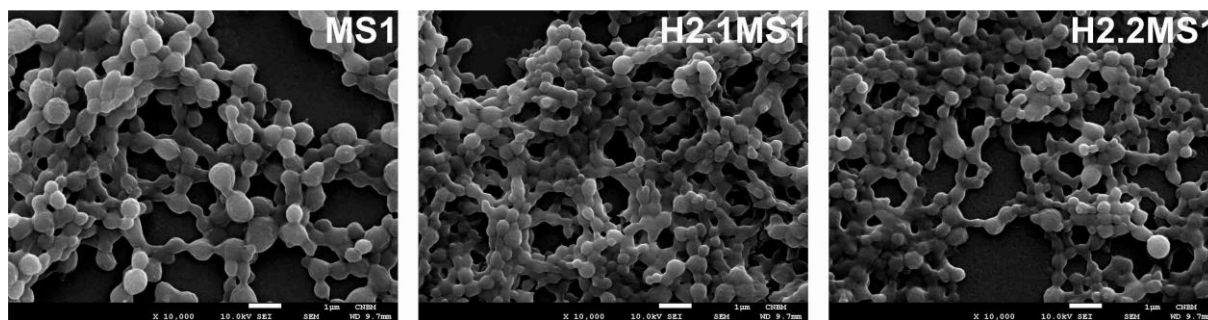
Warianty białek funkcjonalizowane na N-końcu sekwencji jedwabiu wykazywały najbardziej wydajne wiązanie się z komórkami docelowymi w kompleksach z kulkami fluorescencyjnymi, dlatego zostały wybrane do dalszych badań. Sfery wytwarzano wykorzystując metodę mieszania (Ryc. 20).



Ryc. 20 Schematyczne przedstawienie procesu wytwarzania sfer z białka jedwabiu pająkowego przez wysalanie indukowane wysokim stężeniem jonów fosforanowych.

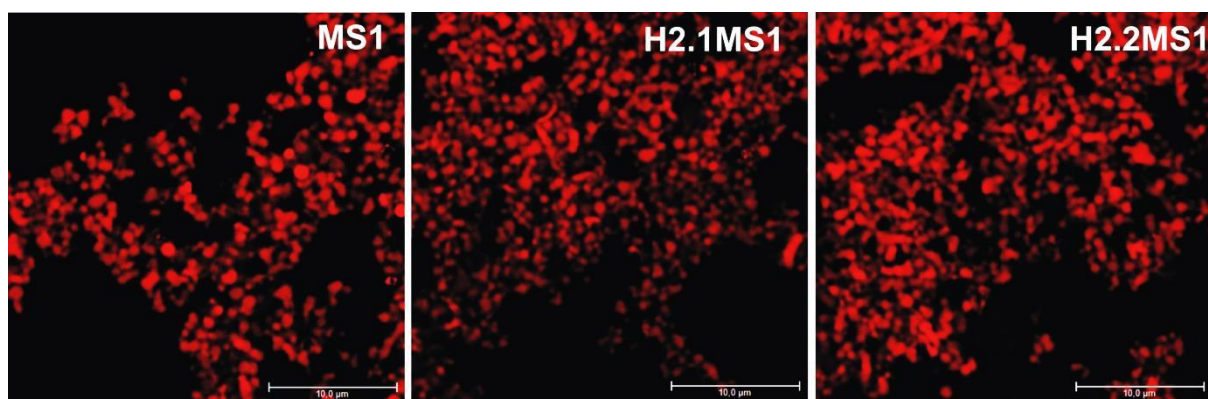
Sfery uzyskano ze wszystkich rodzajów bioinżynierowanych białek (Ryc. 21). Wykazano, że domeny funkcyjne H2.1 i H2.2 nie wpływały na zdolność białek jedwabiu do tworzenia sfer.

Jakościowa charakterystyka sfer przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego wykazała, że wszystkie rodzaje jedwabnych sfer miały podobną morfologię (Ryc. 21). Średni rozmiar sfer wynosił około 400 nm, a rozkład wielkości był następujący: 444 (± 134) nm, 359 (± 114) nm i 399 (± 120) nm, odpowiednio dla sfer MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1.



Ryc. 21 Morfologia sfer wytworzonych z białek jedwabiu MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1. Sfery analizowano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Skala: 1 µm.

Analiza przy pomocy skaningowego mikroskopu konfokalnego potwierdziła tworzenie się sfer zarówno z białka kontrolnego bez domeny funkcyjnej, jak i białek funkcjonalizowanych. Kowalencyjne przyłączenie fluoroforu nie wpływało na proces formowania sfer (Ryc. 22).

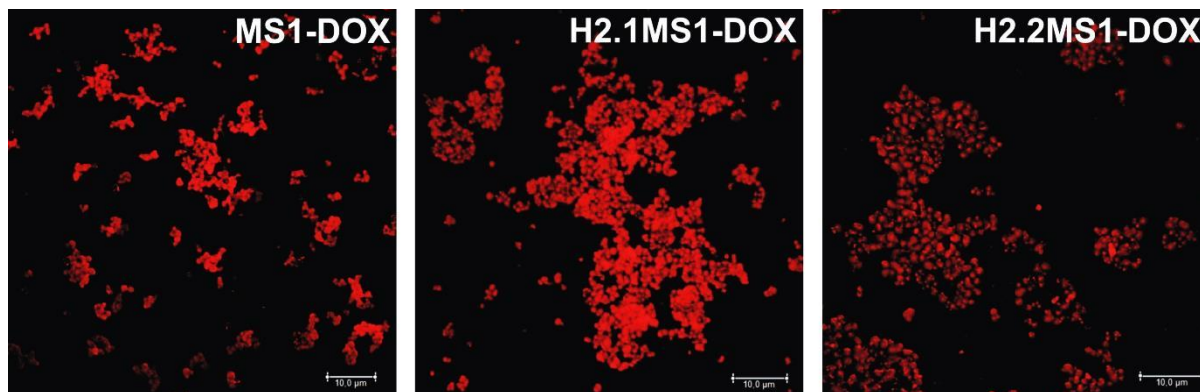


Ryc. 22 Morfologia jedwabnych sfer MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1. Białka do produkcji sfer wyznakowano uprzednio fluoroforem ATTO 647N. Sfery analizowano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego (długość fali wzbudzenia 647 nm; długość fali emisji 661 nm). Skala: 10 µm.

4.6 Inkorporacja dokсорubicyny (Dox) do sfer

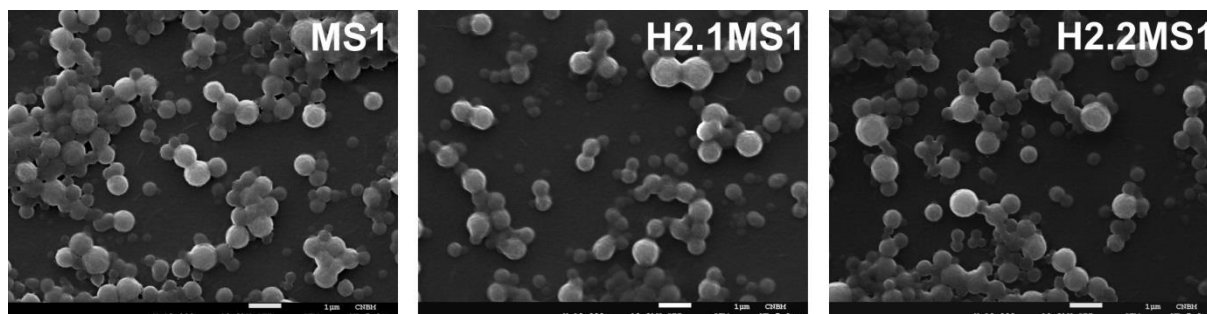
Potencjał jedwabnych sfer do dostarczania leku analizowano przy pomocy Dox. Końcowe stężenia inkorporowanej Dox wynosiły: 364,6 ($\pm 12,3$) ng/ μ g, 338,9 ($\pm 12,1$) ng/ μ g, 357,8 ($\pm 34,9$) ng/ μ g sfer, wytworzonych odpowiednio z MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1. Ponadto,

wykorzystując właściwości fluorescencyjne Dox, potwierdzono z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego inkorporację leku do wnętrza sfer (Ryc. 23).



Ryc. 23 Morfologia sfer po inkorporacji leku modelowego Dox. Sfery MS1-Dox, H2.1MS1-Dox i H2.2MS1-Dox analizowano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu konfokalnego przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/590 nm dla Dox. Skala: 10 μm .

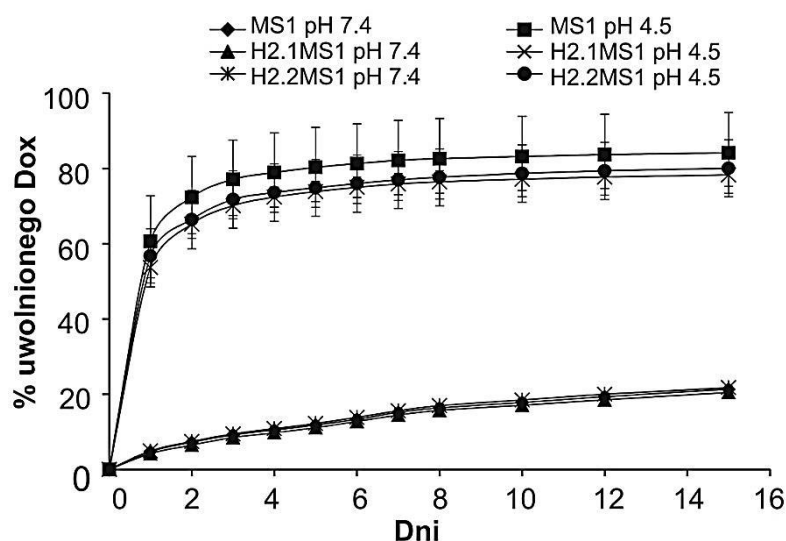
Analiza przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego wykazała, że morfologia sfer z inkorporowaną Dox uległa nieznacznej modyfikacji w porównaniu ze sferami bez leku (Ryc. 24 i Ryc. 21, odpowiednio). Sfery ładowane Dox formowały bardziej kuliste, regularne kształty. Otrzymano następującą przeciętną średnicę i dystrybucję rozmiarów sfer ładowanych Dox: 364,97 ($\pm 122,96$) nm, 356,99 ($\pm 136,15$) nm i 356,5 ($\pm 122,09$) nm, odpowiednio dla MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1.



Ryc. 24 Analiza morfologii sfer ładowanych Dox. Sfery wytworzone z jedwabiu MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1 ładowane lekiem. Skaningowego mikroskopu elektronowego. Skala: 1 μm .

4.7 Uwalnianie Dox ze sfer

Okolo 60% Dox zostało uwolnione w pH 4,5 w ciągu 24 godz. (Ryc. 25), natomiast w ciągu 15 dni obserwowano okolo 80% kumulowanego uwalniania Dox dla wszystkich wariantów sfer. Tempo uwalniania leku w pH 4,5 było szybsze w porównaniu z pH 7,4. Po 15 dniach inkubacji w pH 7,4 wykazano 21,31 ($\pm 1,19$)%, 20,48 ($\pm 0,42$)% i 21,75 ($\pm 0,32$)% całkowitego uwalniania Dox, odpowiednio dla sfer MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1 (Ryc. 25).

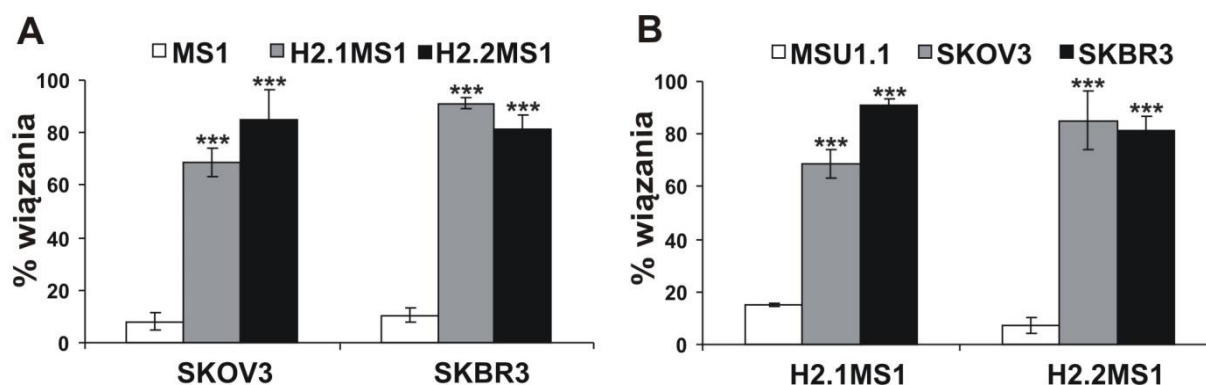


Ryc. 25 Kumulowane uwalnianie leku z jedwabnych sfer. Sfery wytworzone z białek MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1, ładowane Dox zawieszono w PBS o pH 4,5 i 7,4 i inkubowano w 37 °C z ciągłym wytrząsaniem. Dox uwolniony we wskazanych punktach czasowych oznaczano spektrofluorometrycznie. Przedstawiono łączną ilość leku uwolnionego ze sfer w czasie.

4.8 Analiza *in vitro* wiązania sfer do komórek

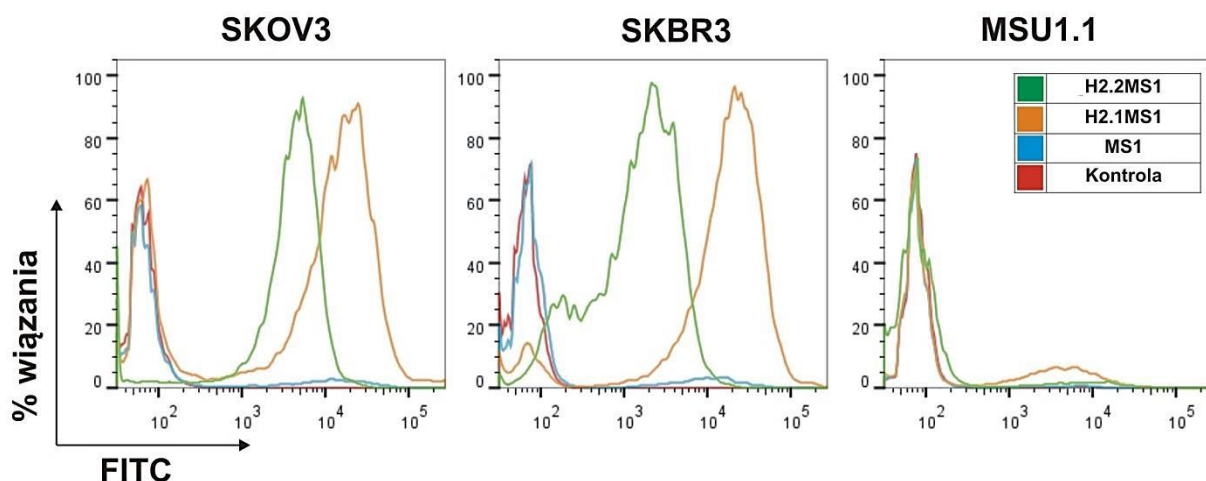
4.8.1 Cytometria przepływowa

Wiązanie funkcjonalizowanych sfer (H2.1MS1 i H2.2MS1) do komórek z nadekspresją Her2 było istotnie statystycznie wyższe niż wiązanie sfer kontrolnych (MS1) (Ryc. 26 A). Stwierdzono nieswoiste wiązanie do Her2-negatywnych fibroblastów (MSU1.1) na poziomie 3%, 15% i 7% odpowiednio dla wariantów MS1, H2.1MS1, H2.2MS1. Ponadto, wiązanie funkcjonalizowanych sfer H2.1MS1 i H2.2MS1 do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2 było 7-krotnie wyższe niż wiązanie do fibroblastów (Ryc. 26 B).



Ryc. 26 Analiza metodą cytometrii przepływowej wiązania kontrolnych i funkcjonalizowanych sfer jedwabiu do komórek. Komórki z nadekspresją Her2 (SKOV3 i SKBR3) i komórki kontrolne (MSU1.1) inkubowano ze sferami funkcjonalizowanymi (H2.1MS1 i H2.2MS1) i kontrolnymi (MS1), wyprodukowanymi z białek wyznakowanych fluorochromem (FITC). Wiązanie hybrydowych sfer do komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z białkiem kontrolnym bez domeny funkcyjnej (A) i w porównaniu z komórkami Her2-ujemnymi (B) wyrażono jako uśredniony % wiązania (\pm SD) co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (***) oznacza istotność statystyczną ($p < 0,001$).

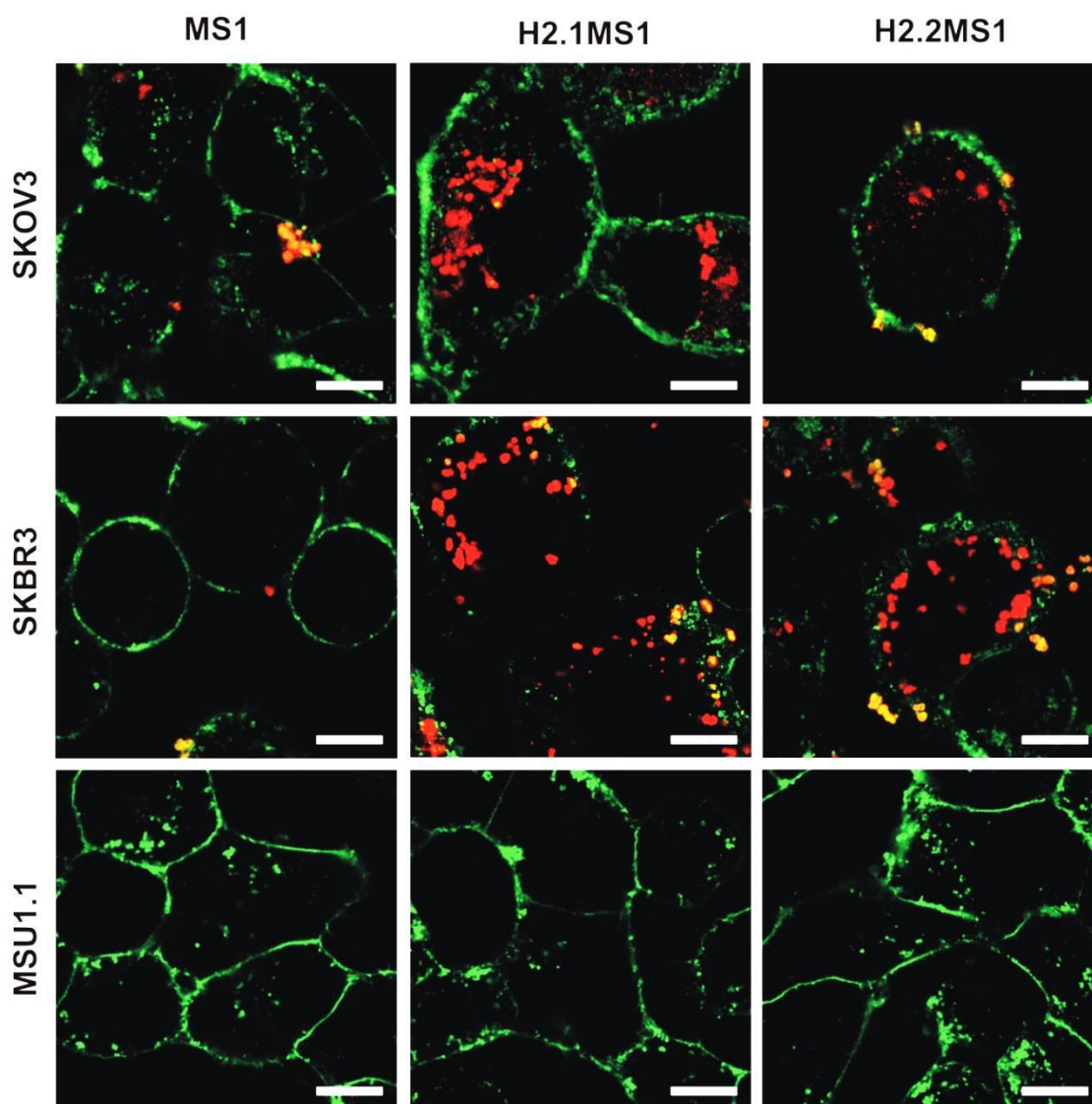
Ryc. 27. przedstawia reprezentatywne wykresy analizy cytometrycznej wiązania jedwabnych sfer do komórek.



Ryc. 27 Reprezentatywne wykresy przedstawiające analizę metodą cytometrii przepływowej wiązania funkcjonalizowanych sfer jedwabiu do komórek. Kontrola – komórki nietraktowane sferami.

4.8.2 Mikroskop konfokalny

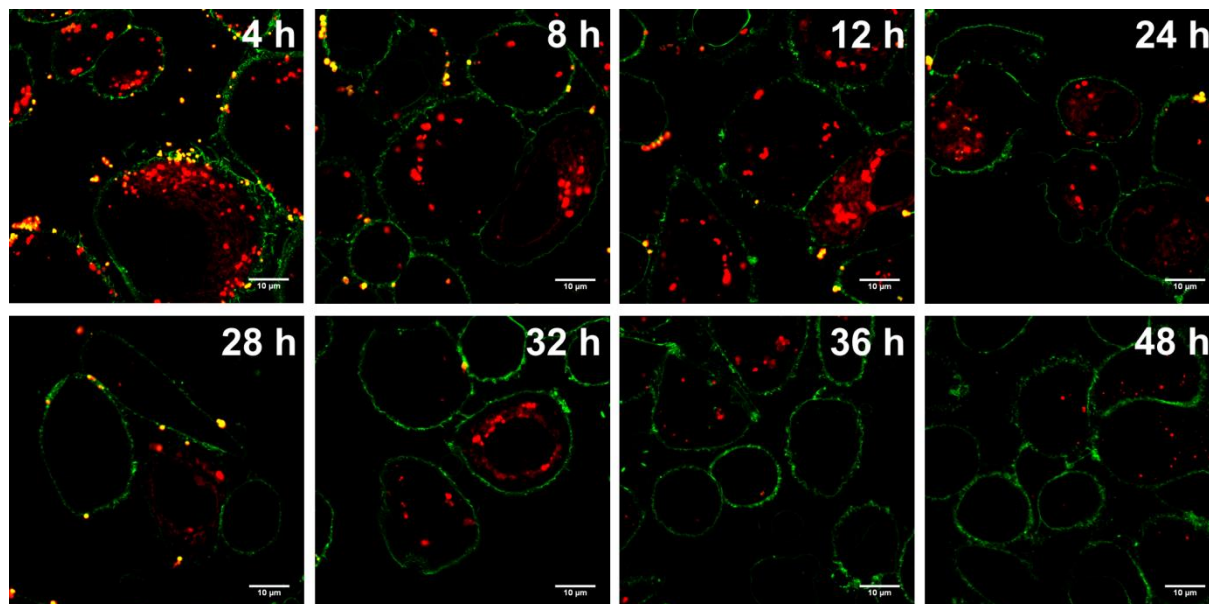
Funkcjonalizowane sfery rozpoznawały komórki Her2-pozytywne i skutecznie je penetrowały (Ryc. 28). Funkcjonalizowane sfery wykonane z białek H2.1MS1 i H2.2MS1 ulegały internalizacji w komórkach wykazujących nadekspresję Her2 (SKOV3 i SKBR3), natomiast nie były pobierane przez komórki kontrolne (MSU1.1). Internalizowane sfery gromadziły się w cytoplazmie, jednak nie zaobserwowano ich wnikania do jądra.



Ryc. 28 Wiązanie i internalizacja jedwabnych sfer do komórek SKOV3, SKBR3 i MSU1.1. Sfery wytworzono z fluorescencyjnie znakowanych białek, kontrolnego MS1 i funkcjonalizowanych H2.1MS1 i H2.2MS1. Błony komórkowe barwiono ConA-FITC. Czerwony – sfery wykonane z białek MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1 sprzężonych z ATTO 647N; zielony – błony komórkowe wybarwione ConA-FITC. Preparaty obrazowano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/525 nm dla FITC oraz 647/661 nm dla ATTO 647N. Skala: 10 μ m.

4.8.3 Internalizacja sfer i ich dystrybucja w czasie

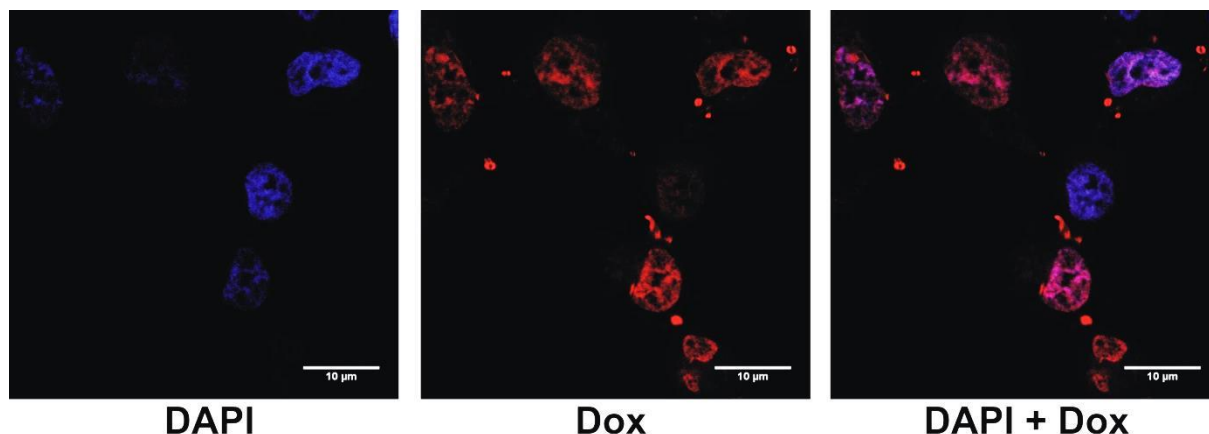
W komórkach SKBR3 stwierdzono zanikanie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od znakowanych sfer wraz z czasem inkubacji (Ryc. 29). Po 48 godz. inkubacji obserwowano bardzo słaby sygnał fluorescencyjny pochodzący ze znakowanych sfer.



Ryc. 29 Dystrybucja wewnątrzkomórkowa jedwabnych sfer H2.1MS1 we wskazanym czasie inkubacji. Zdjęcia komórek SKBR3 wykonano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/525 nm dla FITC oraz 647/661 nm dla ATTO 647N. Czerwony – sfery wytworzone z białka H2.1MS1 sprzężonego z ATTO 647N; zielony – błony komórkowe wybarwione ConA-FITC. Skala: 10 μm.

4.8.4 Dystrybucja Dox *in vitro*

Na Ryc. 30. przedstawiono akumulację molekuł Dox w jądrze komórkowym. Wykazano, że jedwabne sfery akumulowały się głównie w cytoplazmie (Ryc.28 i Ryc. 29), więc lokalizacja cząsteczek Dox w jądrze świadczy, że Dox została uwolniona ze sfer przed wejściem do jądra (Ryc. 30).

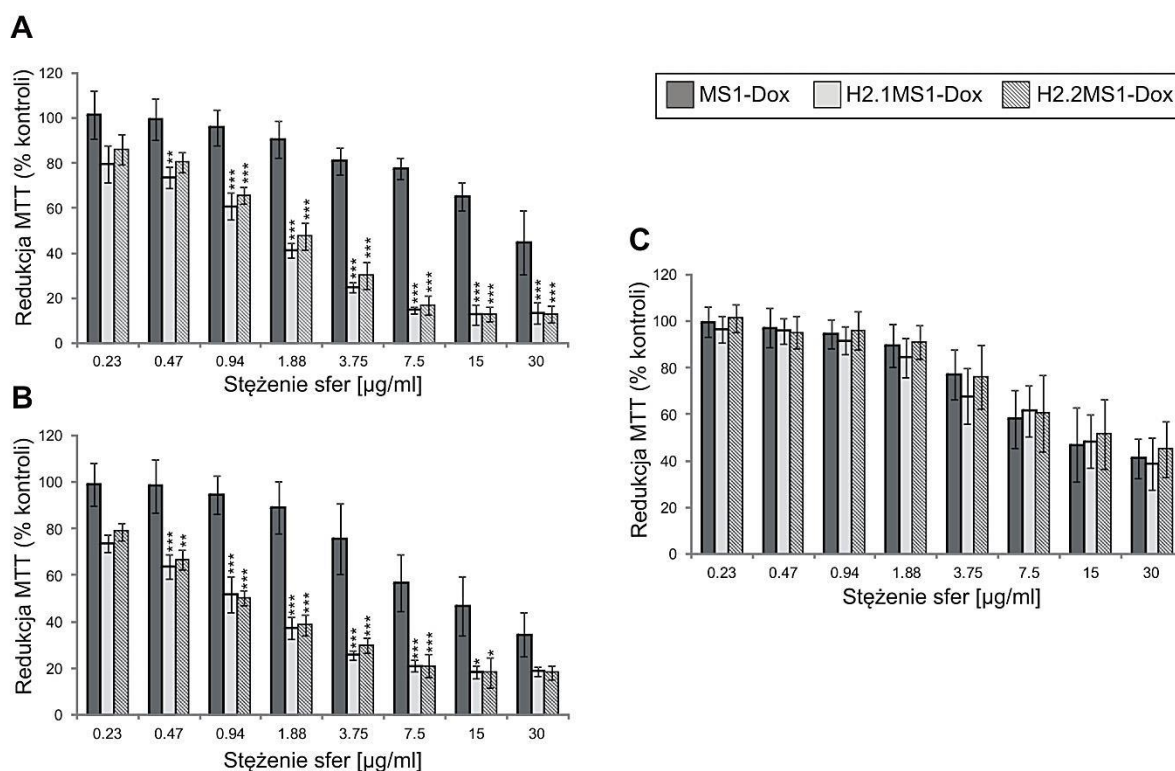


Ryc. 30 Komórki SKBR3 inkubowane ze sferami H2.1MS1 ładowanymi Dox w temp. 37 °C przez 4 godz. Zdjęcia wykonane przy użyciu konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM) przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/575-620 nm dla Dox oraz 405/440-480 nm dla DAPI. Niebieski – jądra wybarwione DAPI; czerwony – sfery ładowane Dox i Dox uwolniony ze sfer. Skala: 10 µm.

4.9 Ocena cytotoksyczności sfer kontrolnych i ładowanych Dox

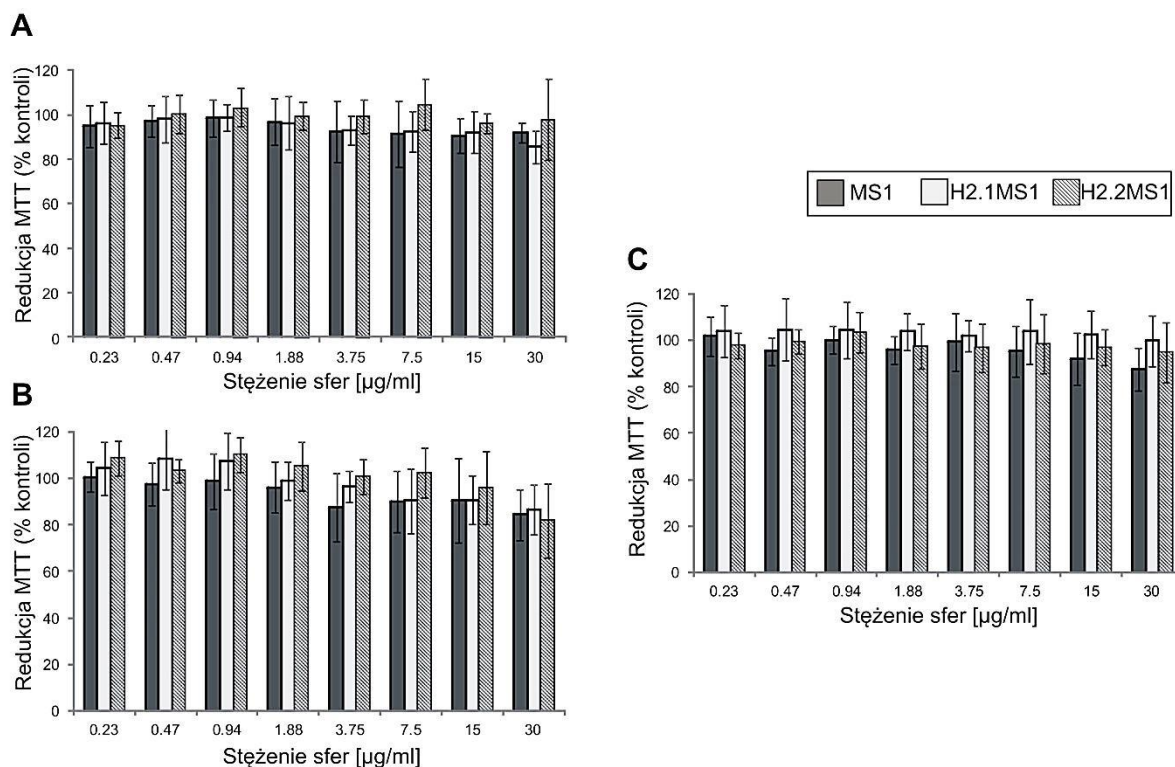
Funkcjonalizowane jedwabne sfery ładowane lekiem istotnie statystycznie zmniejszyły żywotność komórek nowotworowych z nadekspresją Her2 (Ryc. 31 A, B) w porównaniu ze sferami kontrolnymi MS1 bez domeny adresującej, ale z inkorporowanym Dox (Ryc. 31 A, B). Obserwowana cytotoksyczność była zależna od zastosowanej ilości jedwabnych sfer.

Nie wykazano różnic cytotoksyczności indukowanej przez funkcjonalizowane sfery wypełnione lekiem w porównaniu z kontrolnymi sferami w stosunku do komórek Her2-ujemnych (Ryc. 31 C). Najwyższe stężenie sfer ładowanych Dox powodowało cytotoksyczność w komórkach MSU1.1, jednak w przypadku wszystkich testowanych wariantów sfer w stężeniu 1,88 µg/ml żywotność komórek wynosiła około 90%. Jednakowe stężenie funkcjonalizowanych wariantów jedwabnych sfer powodowało zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych nawet do 40 % (Ryc. 31 A, B). Różnice były istotne statystycznie.



Ryc. 31 Badanie cytotoksyczności Dox w teście MTT. Komórki wykazujące nadekspresję Her2 SKOV3 (A) i SKBR3 (B) oraz komórki kontrolne MSU1.1 (C) hodowano w obecności sfer z jedwabiu ładowanych Dox (MS1-Dox, H2.1MS1-Dox i H2.2MS1-Dox) przez 72 godziny (A, B, C). % redukcji MTT obliczono w odniesieniu do komórek kontrolnych nie traktowanych sferami. Wyniki wyrażono jako uśrednienie trzech niezależnych doświadczeń, słupki błędę wskazują odchylenie standardowe. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ i (*) $p < 0,05$.

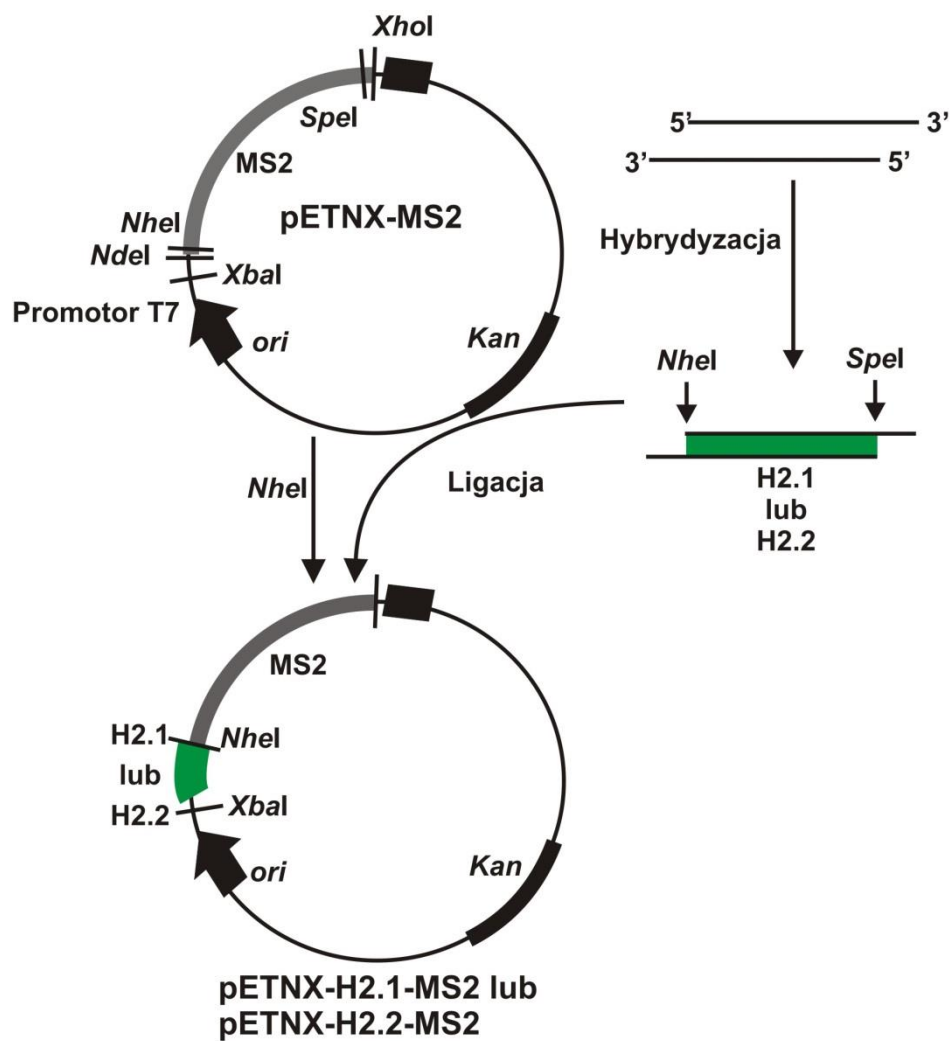
Wykazano, że obserwowana cytotoksyczność wynikała z aktywności dostarczonego leku, ponieważ sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego nie transportujące leku, zarówno kontrolne jak i funkcjonalizowane, nie zmniejszały żywotności komórek w badanym zakresie stężeń (Ryc. 32 A, B i C).



Ryc. 32 Badanie cytotoksyczności jedwabnych sfer w teście MTT. Komórki wykazujące nadekspresję Her2 SKOV3 (A) SKBR3 (B) i komórki kontrolne MSU1.1 (C) hodowano w obecności jedwabnych sfer bez leku (MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1) (A, B, C). % redukcji MTT obliczono w odniesieniu do komórek kontrolnych nie traktowanych sferami. Wyniki wyrażono jako uśrednienie trzech niezależnych eksperymentów, słupki błędę wskazują odchylenie standardowe.

4.10 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych kodujących warianty białek MS2

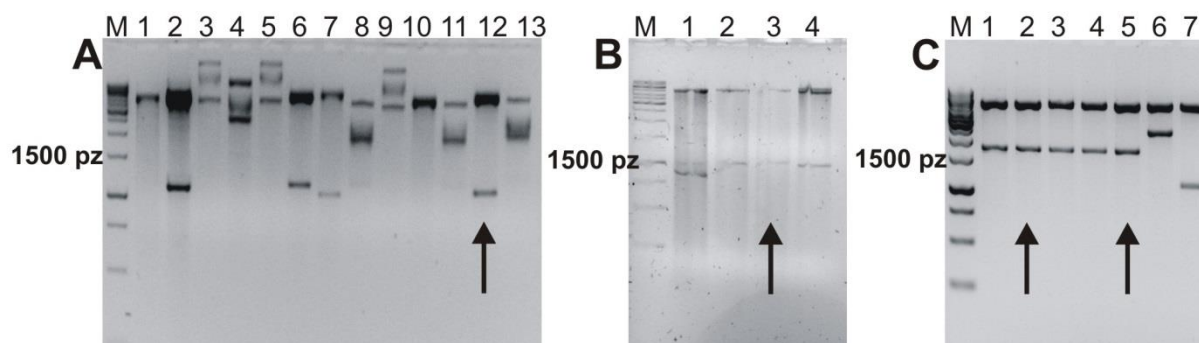
Kolejnym etapem badań było przygotowanie wektorów ekspresyjnych z poszczególnymi wariantami sekwencji kodującymi bioinżynierowane białko jedwabiu MS2 (zawierające 15 powtórzeń sekwencji konsensusowej białka MaSp2 od pająka *N. clavipes*) oraz białka hybrydowe (MS2 z domenami rozpoznającymi receptor Her2). Na podstawie wyników dotyczących wiązania kompleksów różnych wariantów białek MS1 z kulkami fluorescencyjnymi do komórek docelowych, wstawki H2.1 i H2.2 wklonowano na 5'-końcu sekwencji MS2. Schemat konstrukcji wektorów przedstawiono na rycinie 33. Poprawność klonowania wykazano za pomocą analizy restrykcyjnej i rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym (Ryc. 34 i Ryc. 35).



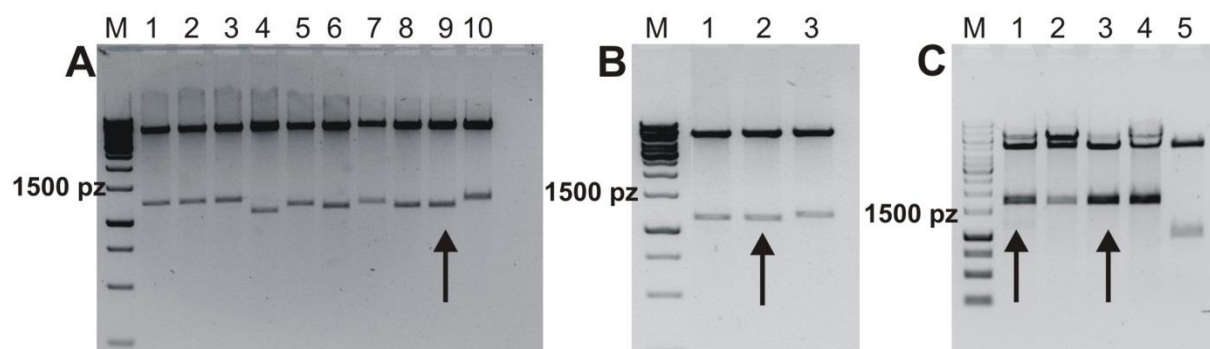
Ryc. 33 Schemat konstrukcji wektorów ekspresyjnych pETNX-MS2 z wklonowaną wstawką (H2.1 lub H2.2) na 5'-końcu sekwencji kodującej białko jedwabiu (MS2).

Tabela 4. Przewidywane długości fragmentów DNA po trawieniu restrykcyjnym wektorów ekspresyjnych.

Wektor	Enzymy restrykcyjne	Długości fragmentów restrykcyjnych
pETNX-H2.1-MS2	<i>NdeI/XhoI</i>	5233 + 1731 pz
	<i>NheI/SpeI</i>	5251 + 1713 pz
pETNX-H2.2-MS2	<i>NdeI/XhoI</i>	5233 + 1719 pz
	<i>NheI/SpeI</i>	5251 + 1701 pz



Ryc. 34 Rozdział elektroforetyczny plazmidów pETNX-H2.1-MS2 po trawieniu enzymami restrykcyjnym *NdeI/XhoI* (A) oraz *NheI/SpeI* (B, C). Przedstawiono etap konstrukcji 9meru (A, B) oraz 15meru (C). Strzałki wskazują klonów z wprowadzoną wstawką (A) oraz z wstawką w poprawnej orientacji (B, C). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 7 (A, C) oraz ścieżka 4 (B) przedstawiają wytrawiony plazmid kontrolny pETNXMS2 (9mer).

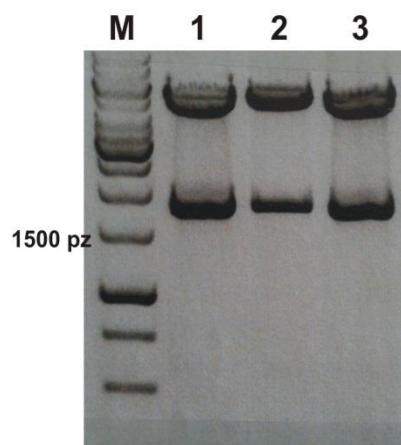


Ryc. 35 Rozdział elektroforetyczny plazmidów pETNX-H2.2-MS2 po trawieniu enzymami restrykcyjnym *NdeI/XhoI* (A) oraz *NheI/SpeI* (B, C). Przedstawiono etap konstrukcji 9meru (A, B) oraz 15meru (C). Strzałki wskazują klonów z wprowadzoną wstawką (A) oraz pozytywne klonów z wstawką w poprawnej orientacji (B, C). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 4 (A) oraz ścieżka 5 (C) przedstawiają wytrawiony plazmid kontrolny pETNXMS2 (9mer).

Analiza restrykcyjna wykazała, że plazmid pETNX-H2.1-MS2 wyizolowany z klonów nr 2 i 5 oraz plazmid pETNX-H2.2-MS2 wyizolowany z klonów nr 1 i 3 posiadają poprawnie wprowadzoną wstawkę do wektora. Otrzymane długości DNA były zgodne z długością obliczoną na podstawie mapy plazmidu (Tab. 4 oraz Ryc. 33). Wynik został potwierdzony przez sekwencjonowanie.

4.11 Ekspresja bioinżynierowanych jedwabi MS2

Plazmidy kodujące poszczególne warianty białek jedwabiu pajęczego pETNX-MS2, pETNX-H2.1-MS2 i pETNX-H2.2-MS2 wprowadzono do bakterii BLR (DE3) na drodze termicznej transformacji. Analiza restrykcyjna plazmidowego DNA z uzyskanych klonów bakteryjnych enzymami *NdeI/XhoI* potwierdziła obecność prawidłowych plazmidów (Ryc. 36).



Ryc. 36 Rozdział elektroforetyczny plazmidów trawionych enzymami *NdeI/XhoI*, wyizolowanych z bakterii ekspresyjnych BLR (DE3). M – marker masy DNA 1kb; ścieżka 1 – plazmid pETNX-H2.1-MS2; ścieżka 2 – plazmid pETNX-H2.2-MS2; ścieżka 3 – kontrolny plazmid pETNX-MS2.

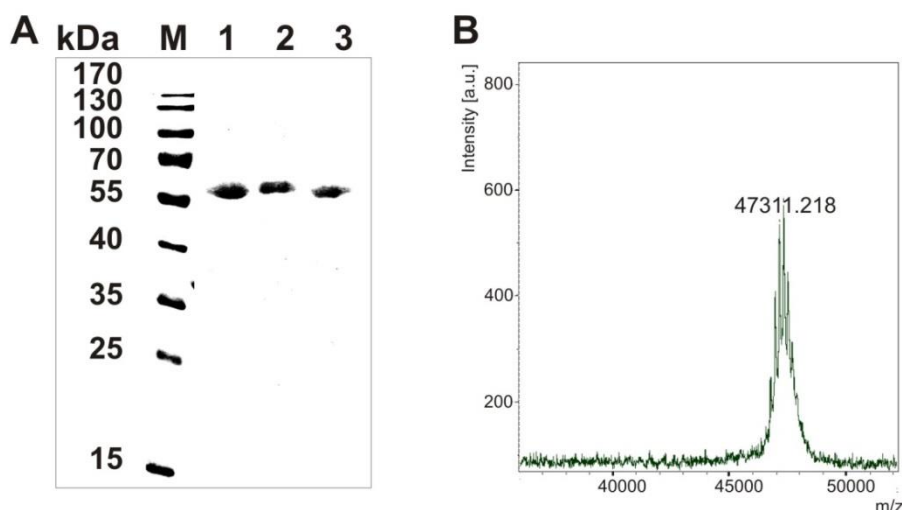
Rekombinowane białko jedwabiu pajęczego MS2 i jego funkcjonalizowane warianty zawierające domeny wiążące Her2 wyprodukowano w systemie *E. coli*. Uzyskano wysoką wydajność produkcji. Ilość mokrego osadu bakteryjnego dla wariantów MS2 była wyższa w porównaniu z otrzymaną ilością MS1 i wynosiła ~60 g peletu na 1 litr hodowli bakteryjnej zarówno dla wariantów kontrolnych, jak i funkcjonalizowanych MS2. Rycina 37. przedstawia sekwencje bioinżynierowanych jedwabi typu MS2.

MS2MAS(GPGGYGPGQQGPSGPGSAAAAAAAAAGPGGYGPGQQT)₁₅**H2.1MS2**MASMYWGDSHWLQYWYETS(GPGGYGPGQQGPSGPGSAAAAAAAAAGPGGYGPGQQT)₁₅**H2.2MS2**MASLTVSPWYTS(GPGGYGPGQQGPSGPGSAAAAAAAAAGPGGYGPGQQT)₁₅

Ryc. 37 Sekwencje aminokwasowe bioinżynierowanego białka jedwabiu pajęczego (MS2) i białek funkcjonalizowanych peptydami wiążącymi Her2. Sekwencje domen funkcyjnych H2.1 i H2.2 zaznaczono kursywą, konsensusowa sekwencja jedwabiu została podkreślona.

4.12 Oczyszczanie białek jedwabiu pajęczego MS2

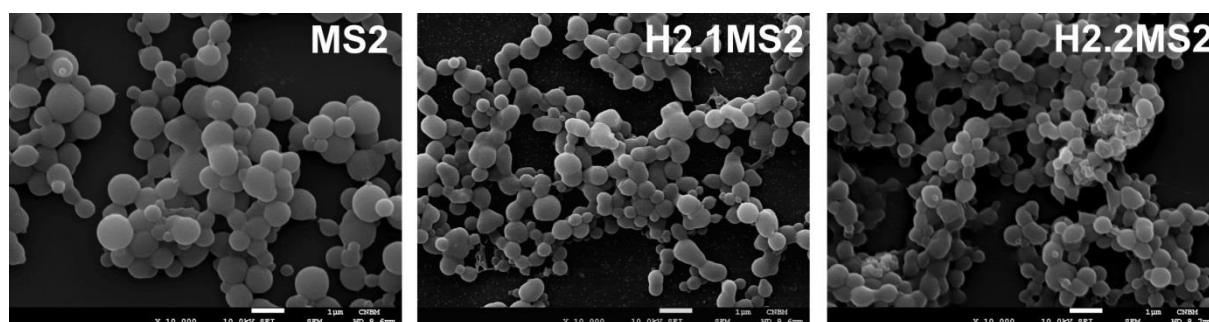
Rekombinowane białko jedwabiu pajęczego MS2 i jego funkcjonalizowane warianty oczyszczono metodą termicznej denaturacji 80/20. Wydajność oczyszczania rekombinowanych białek jedwabiu zależała od rodzaju białka. Otrzymano następujące ilości białek: 78,5 mg/l MS2, 50 mg/l H2.1MS2 oraz 11,7 mg/l białka H2.2MS2. Wykazano, że wydajność oczyszczania jedwabiu typu MS2 była wyższa w porównaniu z wydajnością oczyszczania różnych wariantów białek jedwabiu MS1. Analiza za pomocą rozdziału w 12,5% żelu SDS-PAGE (Ryc. 38 A) wykazała, że obserwowane masy cząsteczkowe bioinżynierowanych białek jedwabiu MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2 odpowiadały w przybliżeniu 60 kDa, różniąc się od teoretycznych mas cząsteczkowych wynoszących 46,72 kDa, 48,57 kDa i 47,76 kDa odpowiednio dla MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2. W związku z tym, masę białka MS2 dodatkowo badano za pomocą analizy MALDI-TOF. Analiza MALDI-TOF wykazała zgodność masy teoretycznej z obserwowaną dla białka MS2 (Ryc. 38 B).



Ryc. 38 (A) Rozdział elektroforetyczny rekombinowanych białek jedwabiu pajęczego w 12,5% żelu SDS-PAGE wybarwionych błękitem koloidalnym. M – marker masy białek Page Ruler (Fermentas), 1 – MS2, 2 – H2.1MS2, 3 – H2.2MS2. (B) Analiza MALDI-TOF białka MS2.

4.13 Wytwarzanie jedwabnych sfer MS2

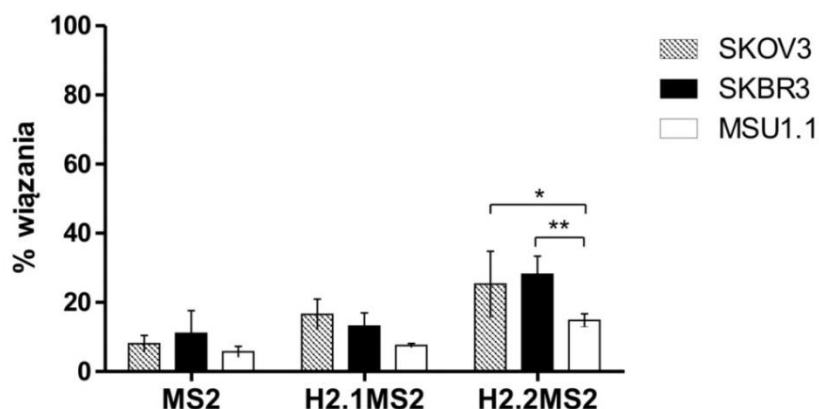
Białko MS2 i jego funkcjonalizowane warianty H2.1MS2 i H2.2MS2 tworzyły regularne, kuliste sfery (Ryc. 39). Sfery utworzone z białek MS2 były bardziej sferyczne w porównaniu z analizowanymi wcześniej cząsteczkami wytworzonymi z wariantów białek MS1 oraz charakteryzowały się mniejszą agregacją. Ponadto, obserwowano mniejsze rozmiary różnych wariantów sfer MS2 w porównaniu z MS1 (Ryc. 39 i Ryc. 24, odpowiednio). Średnia wielkość sfer typu MS2 wynosiła 246 nm, 278 nm i 268 nm, odpowiednio dla białek MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2.



Ryc. 39 Morfologia sfer wytworzonych z białek jedwabiu MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2. Sfery analizowano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Skala: 1 µm.

4.14 Analiza *in vitro* wiązania sfer MS2 do komórek

Znakowane fluorescencyjnie sfery typu MS2 inkubowano z komórkami SKOV3, SKBR3 oraz MSU1.1 i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (Ryc. 40). Dla dwóch z trzech wariantów jedwabiu pajęczego (MS2 i H2.1MS2) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wiązaniu do komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z wiązaniem do kontrolnych komórek MSU1.1. Wiązanie wynosiło średnio 10% w przypadku sfer MS2 i 15% w przypadku sfer H2.1MS2. Dla sfer H2.2MS2 różnice były istotne statystycznie, jednak poziom wiązania był znacząco niższy w porównaniu ze sferami wytworzonymi w oparciu o białka H2.1MS1 i H2.2MS1 (Ryc. 40 i Ryc. 26, odpowiednio). Dla sfer H2.2MS2 wiązanie do obu Her2-dodatnich linii komórkowych wynosiło w przybliżeniu 30%, podczas gdy dla sfer H2.2MS1 obserwowano wiązanie odpowiednio 85% dla komórek SKOV3 i 81% dla SKBR3.



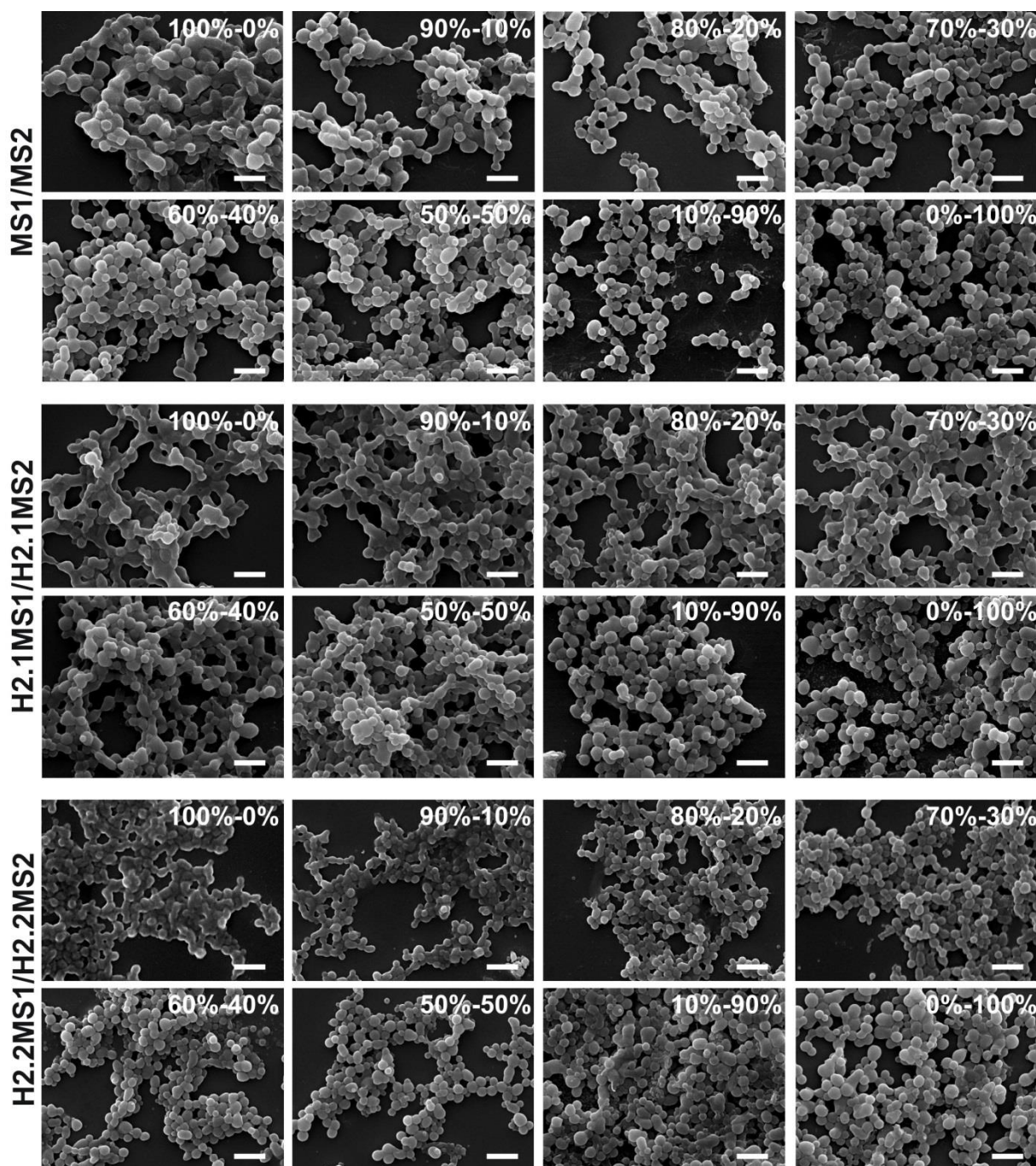
Ryc. 40 Analiza wyników cytometrii przepływowej wiązania jedwabnych sfer typu MS2 do komórek. Komórki z nadekspresją Her2 (SKOV3 i SKBR3) i komórki kontrolne (MSU1.1) inkubowano ze sferami funkcjonalizowanymi (H2.1MS2 i H2.2MS2) i kontrolnymi (MS2), wyprodukowanymi z białek znakowanych fluorochromem (FITC). Wiązanie wyrażono jako średni % wiązania (\pm SD) co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (**) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$.

4.15 Wytwarzanie jedwabnych sfer z mieszanek MS1 i MS2

Funkcjonalizowane sfery MS1 wiązały się wydajnie do komórek Her2-pozytywnych, w przeciwieństwie do funkcjonalizowanych sfer MS2. Jednakże, sfery MS2 charakteryzowały się lepszą morfologią. Dlatego, w celu optymalizacji właściwości fizycznych sfer i ich

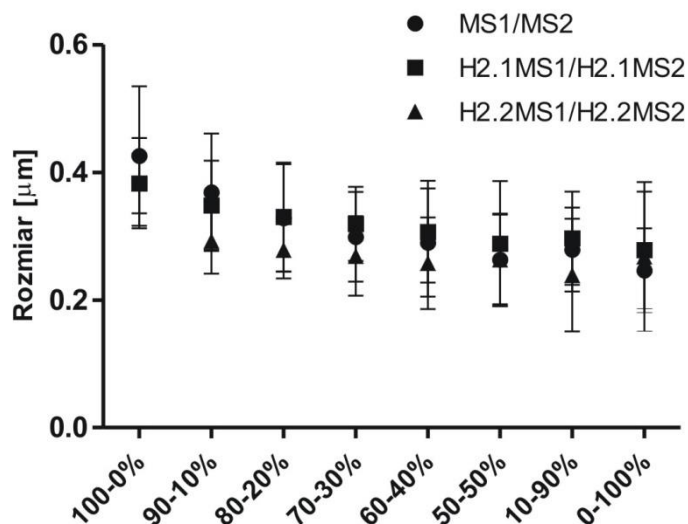
aktywności biologicznej sfery produkowano z mieszaniny białek MS1 i MS2. Białka mieszano w następujących stosunkach wagowych: 90/10%, 80/20%, 70/30%, 60/40%, 50/50%, 10/90% (kontrolne i funkcjonalizowane białka MS1/MS2, odpowiednio). Zwiększenie zawartości białka MS2 w mieszankach MS1/MS2 (kontrolne i funkcjonalizowane) powodowało polepszenie morfologii sfer, tj. sfery charakteryzowały się bardziej zdefiniowanym kulistym kształtem i miały mniejszą tendencję do tworzenia agregatów (Ryc. 41).

Domeny funkcyjne H2.1 i H2.2 nie wpływały na właściwość tworzenia sfer z mieszaniny białek jedwabiu pajęczego (Ryc. 41).



Ryc. 41 Morfologia sfer wytworzonych z mieszanek białek jedwabiu MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2 i H2.2MS1/H2.2MS2 w różnych stosunkach wagowych. Sfery analizowano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Skala: 1 µm.

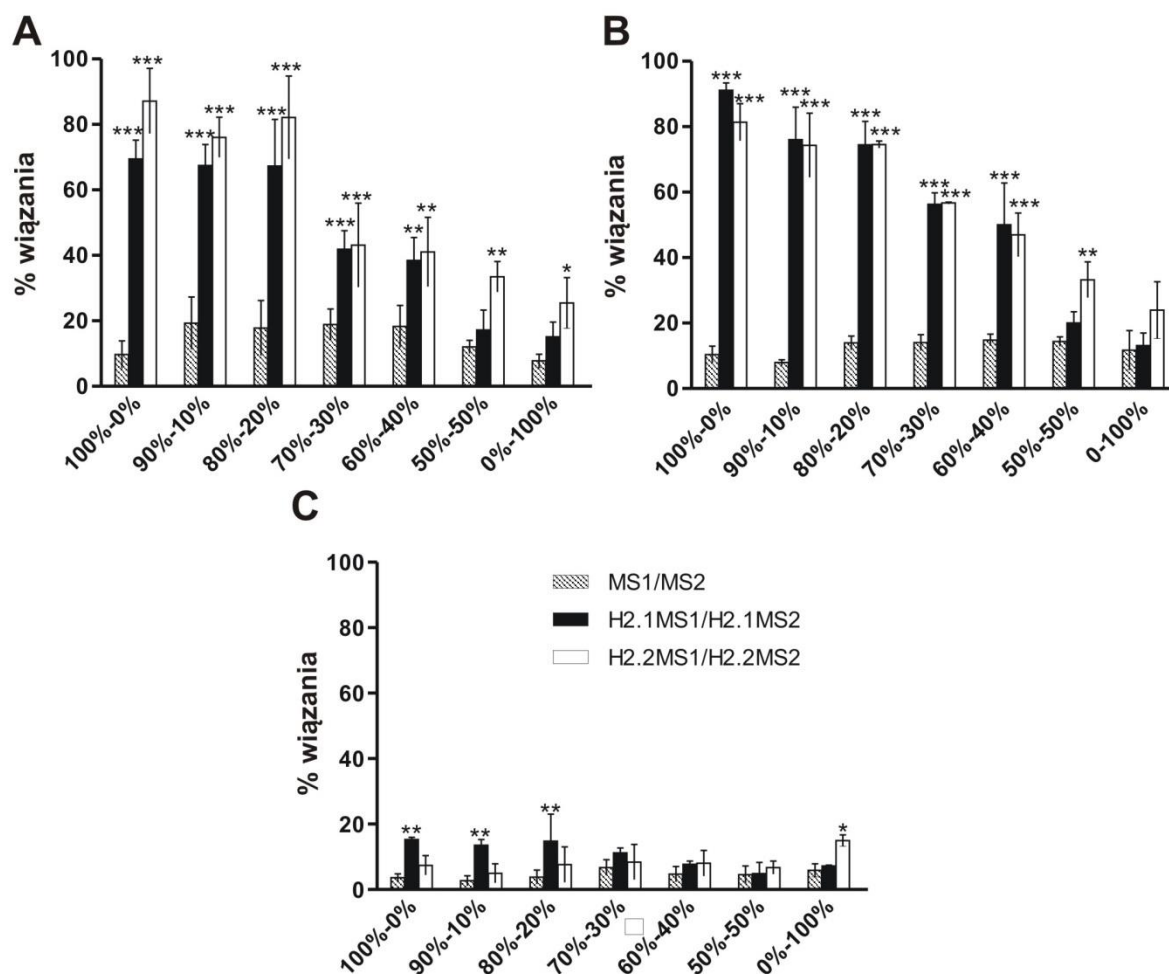
Zwiększenie stężenia białka MS2 w mieszankach MS1/MS2 powodowało zmniejszenie rozmiaru sfer (Ryc. 41 i Ryc. 42). Przeciętna średnica sfer zmniejszyła się dla mieszanek 90/10% i 10/90% odpowiednio z około 426 (± 109) nm do 246 (± 66) nm dla sfer MS1/MS2, z 382 (± 70) nm do 278 (± 92) nm dla sfer H2.1MS1/H2.1MS2 oraz z 382 (± 47) do 268 (± 116) nm dla sfer H2.2MS1/H2.2MS2 (Ryc. 32).



Ryc. 42 Rozmiar sfer wytworzonych z mieszanek MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2, H2.2MS1/H2.2MS2 zmierzony za pomocą analizy obrazu ze skaningowego mikroskopu elektronowego.

4.16 Ocena wiązania sfer do komórek za pomocą cytometrii przepływowej

Sfery z mieszanek typu MS1/MS2 znakowane fluoroforem FITC inkubowano z komórkami SKOV3, SKBR3 oraz MSU1.1 a wiązanie analizowano metodą cytometrii przepływowej (Ryc. 43). Wiązanie do komórek Her2-pozytywnych było zależne od ilości dodanego do mieszaniny białka MS2, tj. zwiększenie stężenia białka MS2 w mieszaninach powodowało obniżenie skuteczności wiązania do komórek (Ryc. 43 A, B).

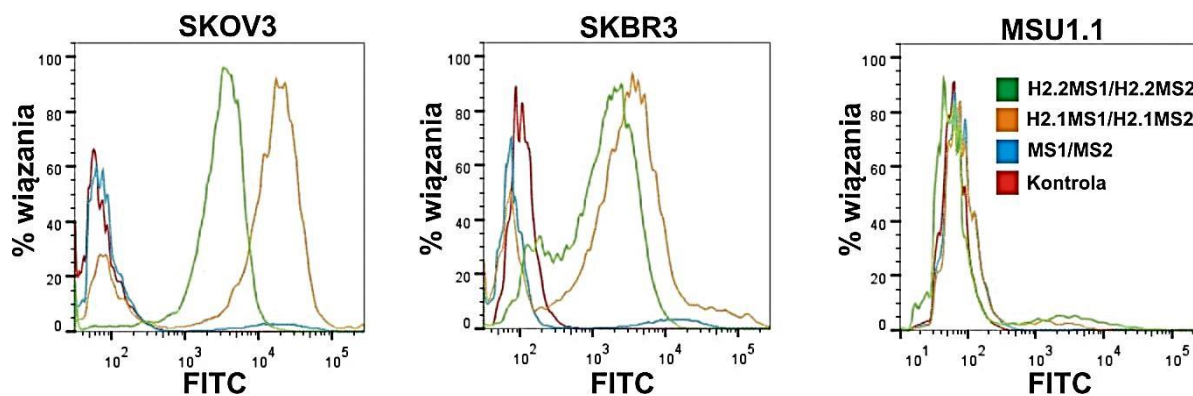


Ryc. 43 Analiza wyników cytometrii przepływowej wiązania kontrolnych i funkcjonalizowanych sfer jedwabiu do komórek. Komórki z nadekspresją Her2 SKOV3 (A) i SKBR3 (B) oraz komórki kontrolne MSU1.1 (C) inkubowano ze sferami wytworzonymi z funkcjonalizowanych i kontrolnych mieszanek białek MS1/MS2 w różnych stosunkach wagowych. Białka uprzednio wyznakowano FITC. Wiązanie wyrażono jako średni % wiązania (\pm SD) co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$.

Zdolność wiązania sfer wytworzonych w oparciu o mieszanki funkcjonalizowanych białek w stosunku wagowym 80/20% (odpowiednio MS1/MS2) była zachowana na poziomie sfer homogennych wykonanych z funkcjonalizowanych białek MS1. Wiązanie sfer H2.1MS1/H2.1MS2 i H2.2MS1/H2.2MS2 (w stosunku wagowym 80/20%) do komórek z nadekspresją Her2 było istotnie statystycznie wyższe niż wiązanie kontrolnych sfer MS1/MS2 (Ryc. 43), a także w stosunku do komórek MSU1.1 (Her2-ujemnych).

Nieswoiste wiązanie do fibroblastów wynosiło poniżej 10% dla wszystkich testowanych wariantów sfer. Ryc. 44. przedstawia reprezentatywną analizę cytometrii

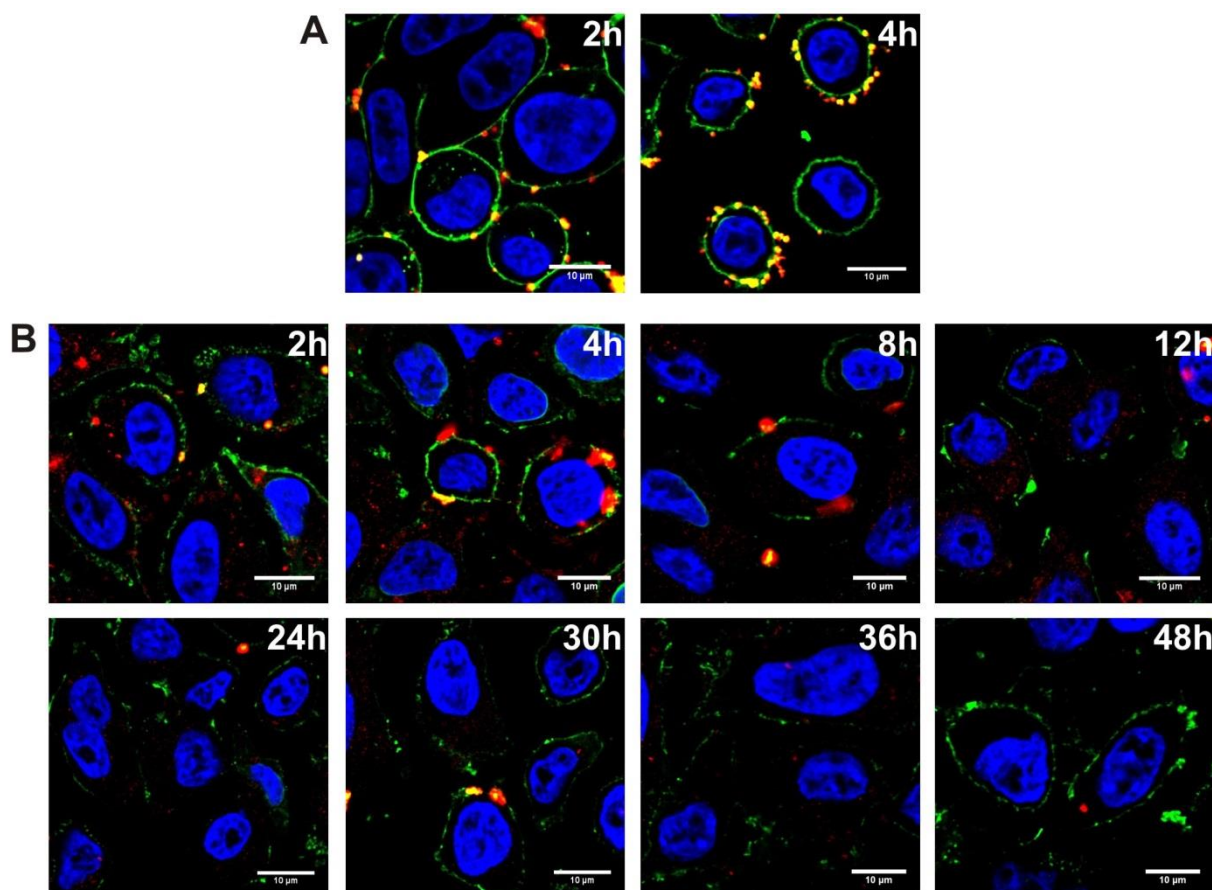
przepływowej wiązania sfer wytworzonych na bazie mieszanek 80/20% do komórek SKOV3, SKBR3 i MSU1.1.



Ryc. 44 Reprezentatywne wykresy przedstawiające analizę metodą cytometrii przepływowej wiązania funkcjonalizowanych sfer z mieszanek jedwabiu w stosunku wagowym 80/20% do komórek. Kontrola – komórki nietraktowane sferami.

4.17 Internalizacja sfer MS2 do komórek i ich dystrybucja w czasie

Na Ryc. 45 B. przedstawiono wiązanie oraz internalizację funkcjonalizowanych sfer do komórek SKBR3 w trakcie inkubacji w temp. 37 °C. Sfery, które uległy internalizacji gromadziły się w cytoplazmie komórek, ale nie wnikały do jądra. Ponadto, zaobserwowano zanikanie sygnału pochodzącego od znakowanych fluorescencyjnie sfer wraz z wydłużaniem czasu inkubacji (Ryc. 45 B). Wykazano również, że komórki poddane inkubacji w temperaturze 4 °C nie pobierały sfer. W tym przypadku sfery H2.2MS1/H2.2MS2 gromadziły się na błonie komórkowej (Ryc. 45 A).



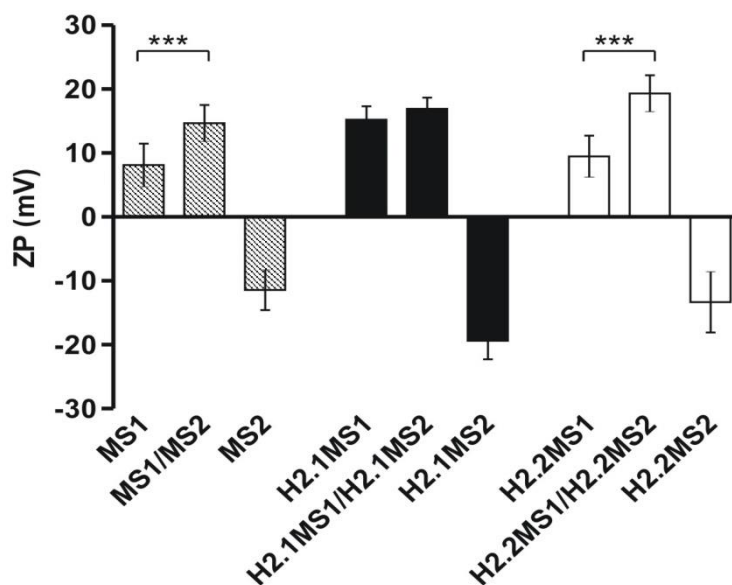
Ryc. 45 Internalizacja i dystrybucja w czasie sfer H2.2MS1/H2.2MS2. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego przedstawiające dystrybucję wewnątrz komórek SKBR3 jedwabnych sfer H2.2MS1/H2.2MS2 we wskazanym czasie inkubacji w temp. 4 °C (A) i 37 °C (B). Czerwony – sfery wytworzone z mieszanki białek H2.2MS1/H2.2MS2 (80/20% w/w) sprzężonych z ATTO 647N; zielony – błony komórkowe wybarwione ConA-FITC; niebieski – jądra komórkowe wyznakowane DAPI. Preparaty obrazowano przy długości fali wzbudzenia/emisji 635/575-675 nm dla ATTO 647N; 488/495-525 nm dla FITC oraz 405/440-480 dla DAPI. Skala: 10 μm .

4.18 Charakterystyka właściwości fizycznych sfer utworzonych z mieszanek białek MS1/MS2 (80/20%)

4.18.1 Potencjał dzeta

Kontrolne i funkcjonalizowane homogenne sfery MS1 i MS2 wykazały różnice w wartościach potencjału dzeta. Sfery MS1 posiadały dodatni potencjał dzeta (8,11 (\pm 3,37) mV, 15,23 (\pm 2,29) mV, 9,48 (\pm 3,09) mV odpowiednio dla sfer MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1), podczas gdy sfery MS2 wykazywały ujemny potencjał dzeta (-11,42 (\pm 3,16) mV, -19,4 (\pm 2,63) mV, -13,31 (\pm 4,87) mV odpowiednio dla sfer MS2, H2.1MS2 i H2.2MS2). Sfery z

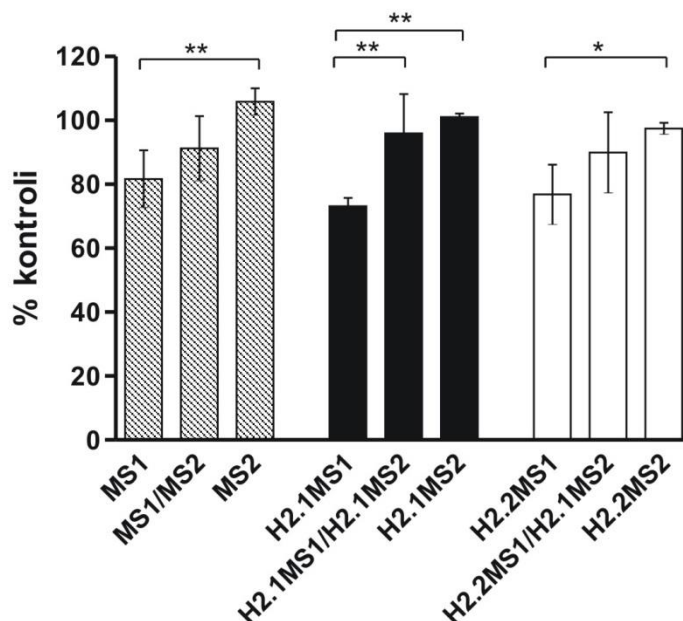
mieszanek jedwabi MS1/MS2 w stosunku wagowym 80/20% (kontrolne i funkcjonalizowane) wykazały wyższe wartości dodatniego potencjału dzeta w porównaniu z jednorodnymi sferami MS1. Dla sfer MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2 i H2.2MS1/H2.2MS2 potencjał dzeta wynosił: 14,38 ($\pm 2,8$) mV, 17,39 ($\pm 1,82$) mV i 19,09 ($\pm 2,81$) mV.



Ryc. 46 Potencjał dzeta sfer wytworzonych z kontrolnych i funkcjonalizowanych białek typu MS1, MS2 i mieszanek MS1/MS2 (w stosunku wagowym 80/20%). (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$.

4.18.2 Stabilność

Sfery wytwarzane są poprzez mieszanie roztworu białka jedwabiu i fosforanu potasu. Następnie otrzymana zawiesina dializowana jest do wody. Stabilność sfer badano poprzez ocenę ilości sfer w zawieszynie przed i po dializie. W przypadku sfer MS1 wykazano, że około 80% sfer pozostało w roztworze po zakończeniu procesu oczyszczania (po dializie), natomiast w przypadku MS2 otrzymano blisko 100% sfer w porównaniu do sfer przed dializą. Domeny funkcyjne H2.1 i H2.2 nie wpływały na stabilność poszczególnych wariantów jedwabiu. Wykazano, że jedwabne sfery z mieszanek 80/20% charakteryzowały się większą stabilnością w porównaniu z homogenicznymi sferami MS1, jednak niższą w porównaniu z jednorodnymi sferami MS2 (Ryc. 47). Dla mieszanki H2.1MS1/H2.1MS2 różnica była istotna statystycznie.

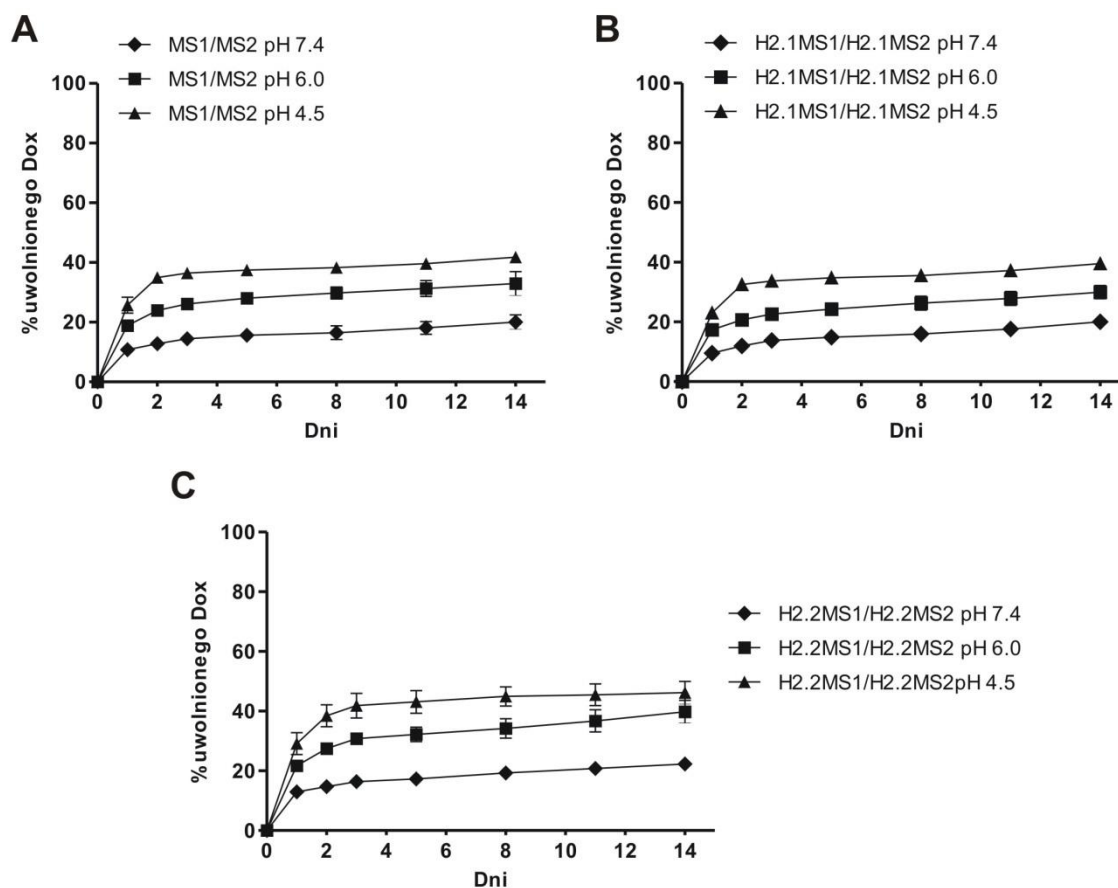


Ryc. 47 Stabilność sfer wytworzonych z kontrolnych i funkcjonalizowanych białek MS1, MS2 i mieszanek MS1/MS2 (w stosunku wagowym 80/20%). Stabilność sfer badano poprzez sprawdzenie ilości sfer w zawieszynie przed i po dializie. Ilość sfer (zmętnienie zawiesziny sfer) oznaczono poprzez pomiar spektrofotometryczny przy 700 nm. (**) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$.

4.19 Ładowanie sfer mieszanek MS1/MS2 (80/20%) lekiem Dox i uwalnianie Dox

Procent inkorporacji Dox do sfer wynosił odpowiednio: dla MS1/MS2 26,68 ($\pm 4,56$)%, dla H2.1MS1/H2.1MS2 27,34 ($\pm 5,04$)% i H2.2MS1/H2.2MS2 22,09 ($\pm 2,75$)%. Uzyskana frakcja inkorporacji Dox w przeliczeniu na ostateczną ilość załadowanego Dox do sfer wynosiła: 514,56 ($\pm 91,2$) ng, 546,78 ($\pm 100,1$) ng i 441,75 ($\pm 55,1$) ng/ μ g sfer odpowiednio dla sfer MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2 i H2.2MS1/H2.2MS2.

Wpływ pH na szybkość uwalniania leku badano inkubując trzy warianty sfer ładowanych Dox (MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2, H2.2MS1/H2.2MS2) w pH 4,5, 6 i 7,4 (Ryc. 48).

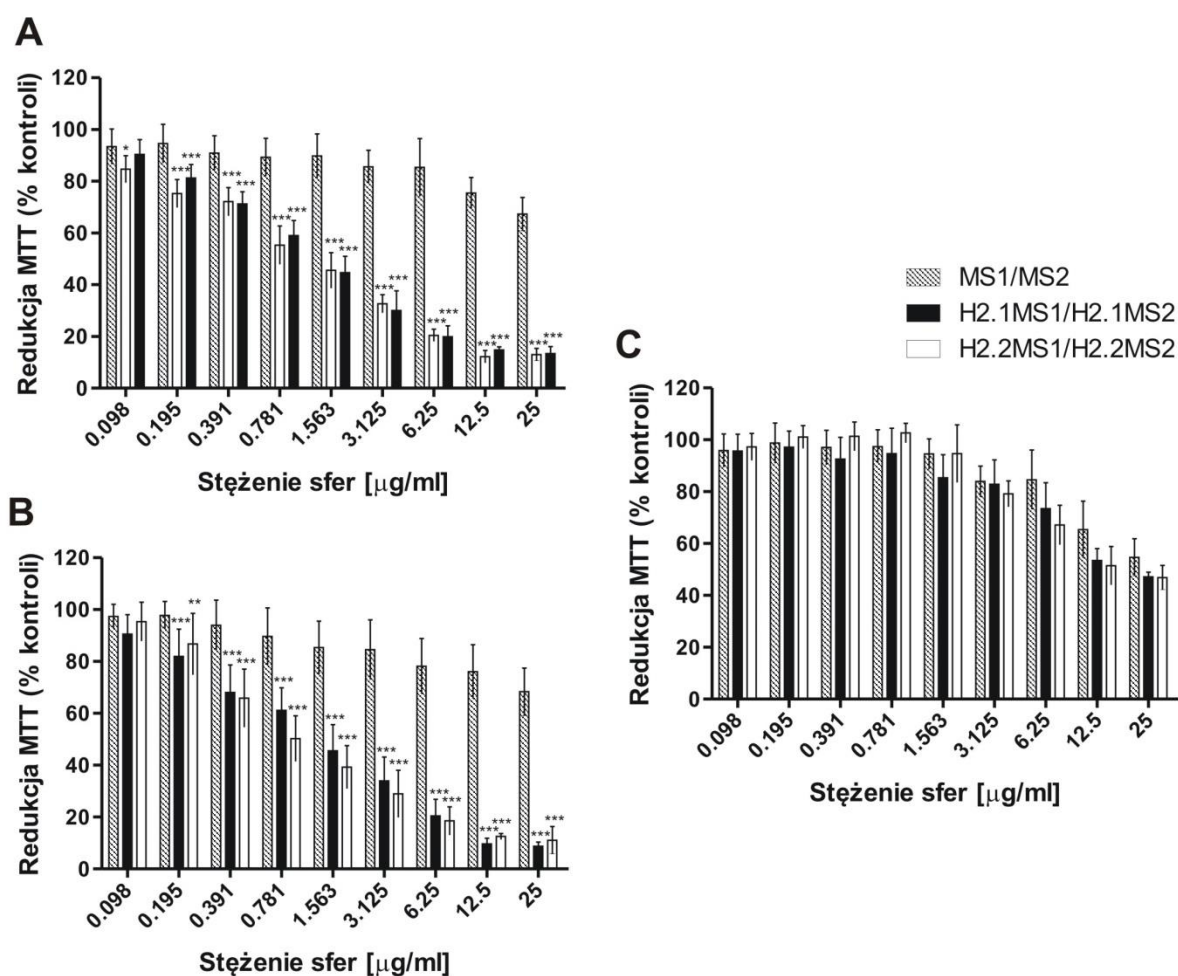


Ryc. 48 Kumulowane uwalnianie leku z jedwabnych sfer. Sfery wytworzone z mieszanek 80/20% białek MS1/MS2 (A), H2.1MS1/H2.1MS2 (B) i H2.2MS1/H2.2MS2 (C), ładowane Dox zawieszono w PBS o pH 4,5, 6 i 7,4, po czym inkubowano w 37 °C z ciągłym wytrząsaniem. Dox uwolniona we wskazanych punktach czasowych oznaczano spektrofotometrycznie. Przedstawiono łączną ilość leku uwolnionego ze sfer w jednostce czasu.

Porównanie profili uwalniania Dox wykazało, że czynnikiem przyspieszającym proces uwalniania było niskie pH. Zaobserwowano, że gwałtowny wyrzut leku następował w początkowym etapie eksperymentu. Przy pH 4,5 wszystkie badane warianty sfer szybko uwalniały Dox – około 25%, 23% i 29% leku zostało uwolnione w ciągu 24 godzin (odpowiednio dla sfer MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2, H2.2MS1/H2.2MS2). Około 40% skumulowanego uwalniania Dox obserwowano w ciągu 14 dni dla wszystkich wariantów sfer. Natomiast po 14 dniach inkubacji w pH 7,4 wykazano odpowiednio dla sfer MS1/MS2 – 20,03 ($\pm 2,41$)%, dla sfer H2.1MS1/H2.1MS2 – 20,07 ($\pm 1,43$)% i dla sfer H2.2MS1/H2.2MS2 – 22,27 ($\pm 1,53$)% uwalniania Dox (Ryc. 48).

4.20 Ocena cytotoksyczności sfer mieszanek MS1/MS2 (80/20%) ładowanych Dox

Cytotoksyczność funkcjonalizowanych sfer (H2.1MS1/H2.1MS2-Dox i H2.2MS1/H2.2MS2-Dox) w stosunku do Her2-dodatnich komórek nowotworowych była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu ze sferami kontrolnymi (MS1/MS2-Dox) (Ryc. 49 A, B). Podczas gdy funkcjonalizowane sfery wykazywały zmniejszenie żywotności komórek w zależności od dawki, nawet największe zastosowane stężenie sfer kontrolnych bez domen adresujących (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nie indukowało znaczącej cytotoksyczności w liniach komórek nowotworowych.



Ryc. 49 Cytotoksyczność Dox. Komórki wykazujące nadekspresję Her2 SKOV3 (A) i SKBR3 (B) oraz komórki kontrolne MSU1.1 (C) hodowano w obecności sfer z mieszanek jedwabiu ładowanych Dox (MS1/MS2-Dox, H2.1MS1/H2.1MS2-Dox i H2.2MS1/H2.2MS2-Dox) przez 72 godz. % redukcji MTT obliczono w odniesieniu do komórek kontrolnych nie traktowanych sferami. Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech niezależnych eksperymentów, słupki błędów wskazują odchylenie standardowe. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ i (*) $p < 0,05$.

Wartości współczynnika IC_{50} dla Dox dostarczanej w sferach do komórek SKOV3 wynosiły odpowiednio dla MS1/MS2, H2.1MS1/H2.1MS2 i H2.2MS1/H2.2MS2: $\sim 14,34$, $\sim 0,65$ i $\sim 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. Dla komórek SKBR3 wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio $\sim 15,29$, $\sim 0,68$ i $\sim 0,28$ $\mu\text{g/ml}$.

Nie wykazano znaczących różnic żywotności komórek Her2-ujemnych eksponowanych na kontrolne i funkcjonalizowane sfery ładowane Dox we wszystkich badanych stężeniach (Ryc. 49 C). Dodatkowo, wykazano znacznie niższą cytotoksyczność w komórkach linii MSU1.1 w porównaniu z komórkami SKBR3 i SKOV3 przy tej samej dawce funkcjonalizowanych sfer ładowanych Dox. Stężenie sfer $1,563$ $\mu\text{g/ml}$ powodowało toksyczność w komórkach nowotworowych SKOV3 i SKBR3 na poziomie około 40% dla obu funkcjonalizowanych wariantów (Ryc. 49 A, B), podczas gdy żywotność komórek MSU1.1 nadal wynosiła około 90% w przypadku wszystkich badanych prób (Ryc. 49 C).

4.21 Przygotowanie komórek transfekowanych genem lucyferazy

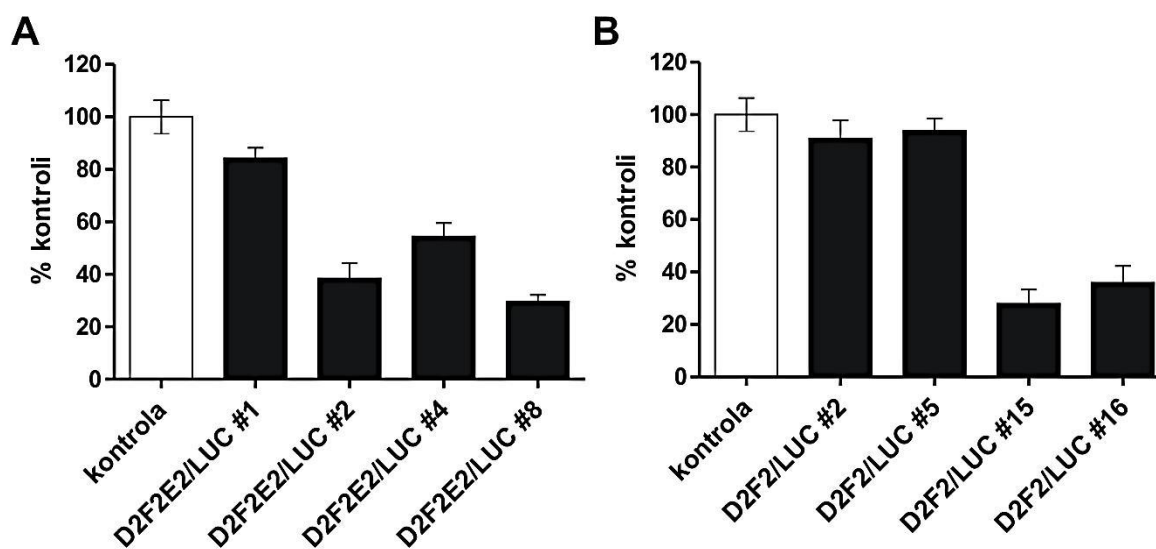
W celu przyżyciowego obrazowania komórek w modelu *in vivo*, mysie komórki raka piersi D2F2/E2 i D2F2 transfekowano genem lucyferazy, po czym przeprowadzono selekcję. Wyselekcjonowane klony przetestowane pod kątem intensywności luminescencji po dodaniu substratu – lucyferyny przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Analiza intensywności luminescencji klonów komórek D2F2/E2 i D2F2 transfekowanych genem lucyferazy.

Linia komórkowa	# Klon	Intensywność luminescencji [U]
D2F2/E2/LUC	1	11538765
	2	2564732
	4	3977524
	8	15723310
D2F2/LUC	2	69269000
	5	6899177
	15	4295294
	16	6476427

Przedstawiono wyselekcjonowane klony wykazujące największą intensywność bioluminescencji.

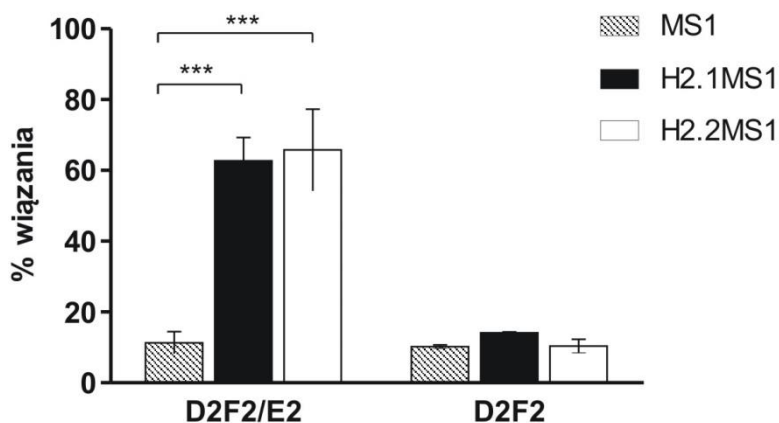
Klony charakteryzujące się największą intensywnością luminescencji analizowano pod względem proliferacji w odniesieniu do kontrolnych komórek (niemodyfikowanych) (Ryc. 50). Klony D2F2/E2/LUC #1 (Ryc. 50 A) oraz D2F2/LUC #2 i D2F2/LUC #5 (Ryc. 50 B) proliferowały w sposób najbardziej zbliżony do kontrolnych komórek nie poddanych modyfikacjom. Do modelu *in vivo* wybrano klony D2F2/E2/LUC #1 i D2F2/LUC #5 wykazujące podobny poziom luminescencji.



Ryc. 50 Proliferacja komórek D2F2/E2 i D2F2 transfekowanych genem lucyferazy oznaczona za pomocą testu MTT. Komórki posiewano w ilości 10 tysięcy komórek/dołek i hodowano przez 72 godziny. Porównywano tempo proliferacji komórek niemodyfikowanych (kontrola) i wybranych na podstawie intensywności luminescencji klonów transfekowanych linii D2F2/E2/LUC (A) i D2F2/LUC (B).

4.22 Analiza *in vitro* wiązania sfer do komórek D2F2/E2 i D2F2

Znakowane fluorescencyjnie sfery inkubowano z mysimi komórkami raka piersi D2F2/E2 oraz D2F2, a następnie analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (Ryc. 51). Dla obu wariantów funkcjonalizowanego jedwabiu pajęczego (H2.1MS1 i H2.2MS1) wykazano istotne statystycznie różnice w wiązaniu do komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu ze sferami kontrolnymi MS1. Ponadto, poziom wiązania do kontrolnych komórek D2F2 był znacząco niższy i wynosił średnio 15% w przypadku wszystkich wariantów sfer. Nie wykazano różnic statystycznych pomiędzy sferami kontrolnymi i funkcjonalizowanymi dla kontrolnej linii komórek.



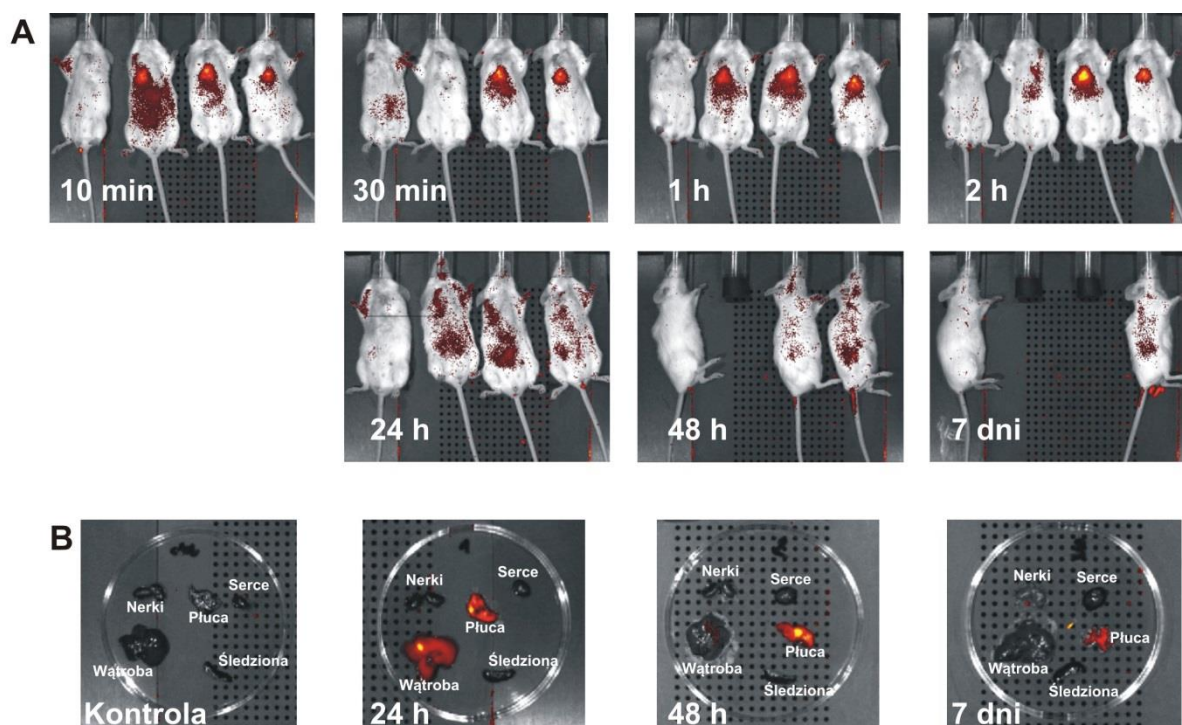
Ryc. 51 Wiązanie funkcjonalizowanych sfer jedwabiu do komórek – analiza metodą cytometrii przepływowej. Mysie komórki raka piersi z nadekspresją Her2 (D2F2/E2) i komórki kontrolne (D2F2) inkubowano ze sferami funkcjonalizowanymi (H2.1MS1 i H2.2MS1) i kontrolnymi (MS1), wyprodukowanymi z białek znakowanych fluorochromem (ATTO 647N). Wiązanie wyrażono jako średni % wiązania (\pm SD) co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$.

4.23 Eksperymentalny model *in vivo* mysich nowotworów piersi – badania wstępne

4.23.1 Dystrybucja jedwabnych sfer *in vivo*

4.23.1.1 Dystrybucja sfer u myszy zdrowych

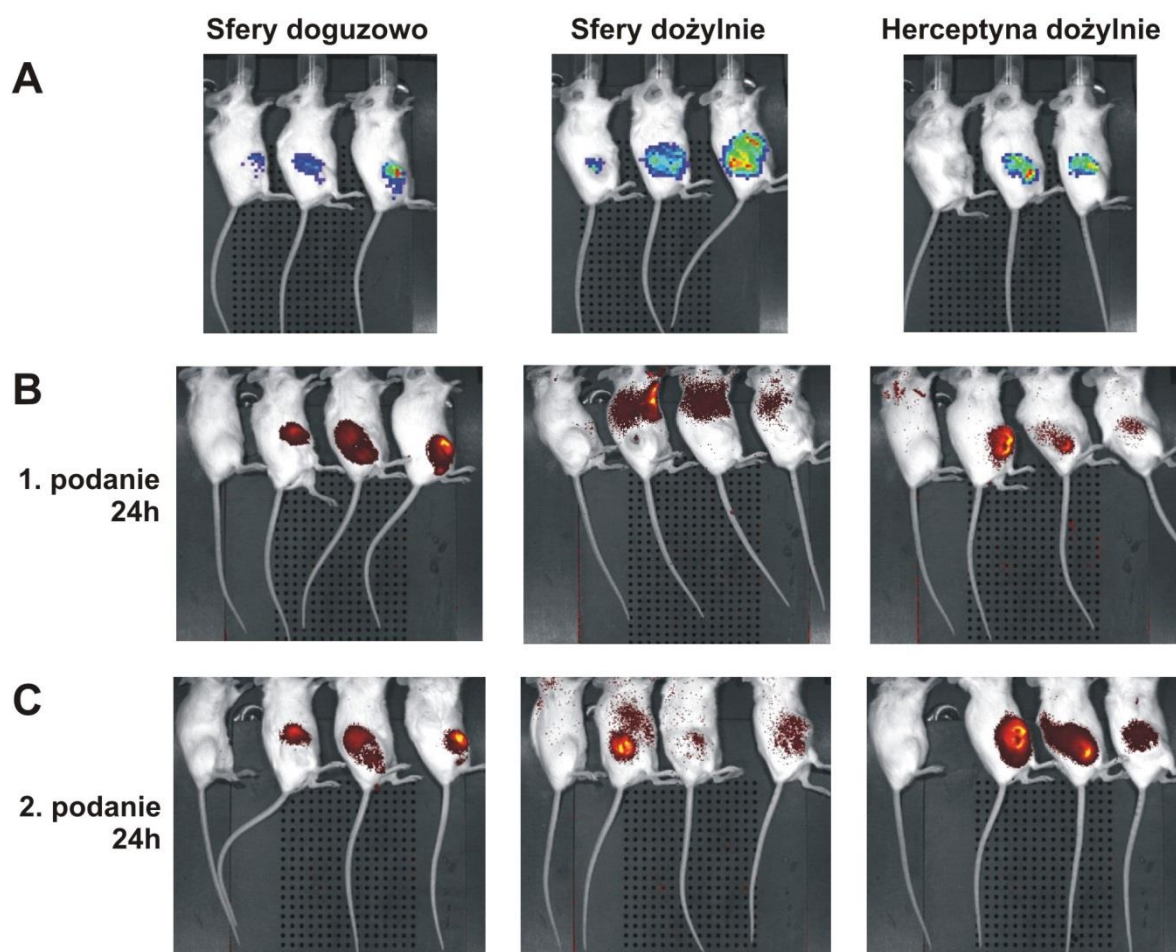
Jednorazowo podane dożylnie jedwabne sfery MS1 (znakowane fluoroforem ATTO 647N) początkowo prawdopodobnie gromadziły się w płucach (Ryc. 52 A – 10 min., 20 min., 1 godz., 2 godz.). Po 24 godz. od podania sygnał fluorescencyjny emitowany przez sfery obserwowano w wątrobie (Ryc. 52 A, B) oraz w płucach (Ryc. 52 B). Sygnał zanikał w miarę upływu czasu. Po 7 dniach od podania znikomy sygnał pochodzący od sfer widoczny był w płucach, natomiast w wątrobie nie obserwowano fluorescencji.



Ryc. 52 Biodystrybucja jedwabnych sfer po podaniu dożylnym myszom zdrowym. (A) Sfery MS1 *in vivo* w różnych punktach czasowych od momentu podania, oraz (B) w izolowanych narządach. W każdym punkcie czasowym kontrolę stanowiła mysz, która nie otrzymała sfer. Obrazowano następujące narządy: serce, płuca, nerki, wątrobę oraz śledzionę. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

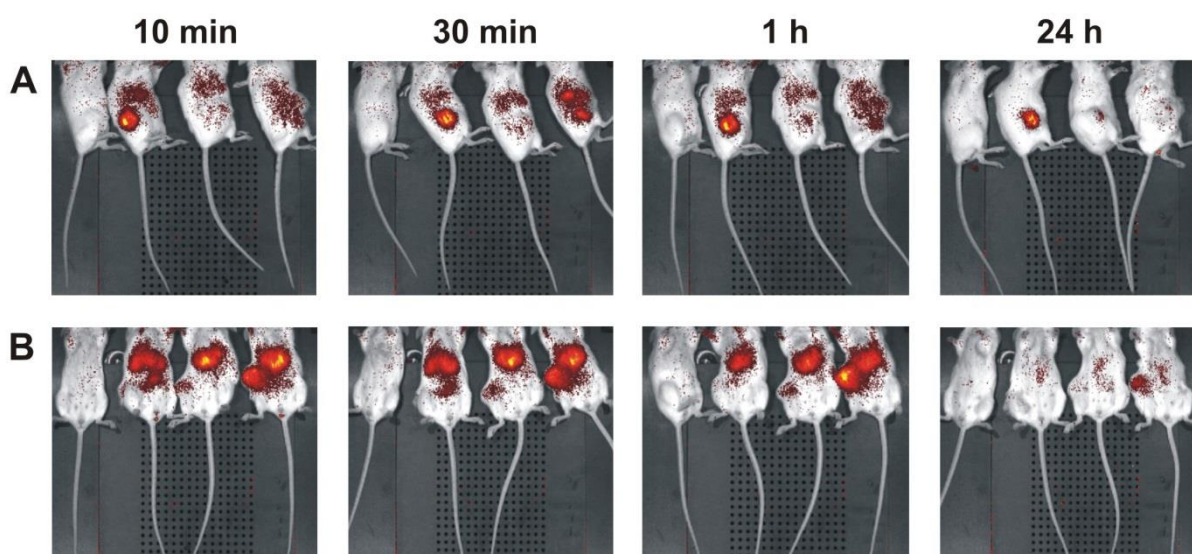
4.23.1.2 Dystrybucja sfer w mysim modelu raka piersi

Myszom podano podskórnym komórki raka piersi – D2F2/E2/LUC (Her2-pozytywne). Po 14 dniach u myszy stwierdzono uformowane guzy (Ryc. 53 A). Wtedy myszom 3-krotnie podano dożylnie lub doguzowo sfery H2.1MS1 w 48-godzinnych odstępach czasowych. Kontrolnej grupie podano herceptynę. Ryc. 53. przedstawia obrazy myszy 24 godz. od pierwszego (Ryc. 53 B) i drugiego (Ryc. 53 C) podania. Po 24 godz. od pierwszego podania dożylnego sfery gromadziły się prawdopodobnie w płucach i wątrobie (Ryc. 53 B). Wykazano akumulację sfer H2.1MS1 po drugim podaniu dożylnym w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie (Ryc. 53 C). Natomiast już po 24 godz. od pierwszego podania doguzowego sfer obserwowano intensywny sygnał fluorescencyjny w guzie (Ryc. 53 B). Herceptyna kumulowała się w miejscu guza 24 godziny od pierwszej iniekcji (Ryc. 53 B). Obserwowano wzrost intensywności sygnału po drugim podaniu (Ryc. 53 C).



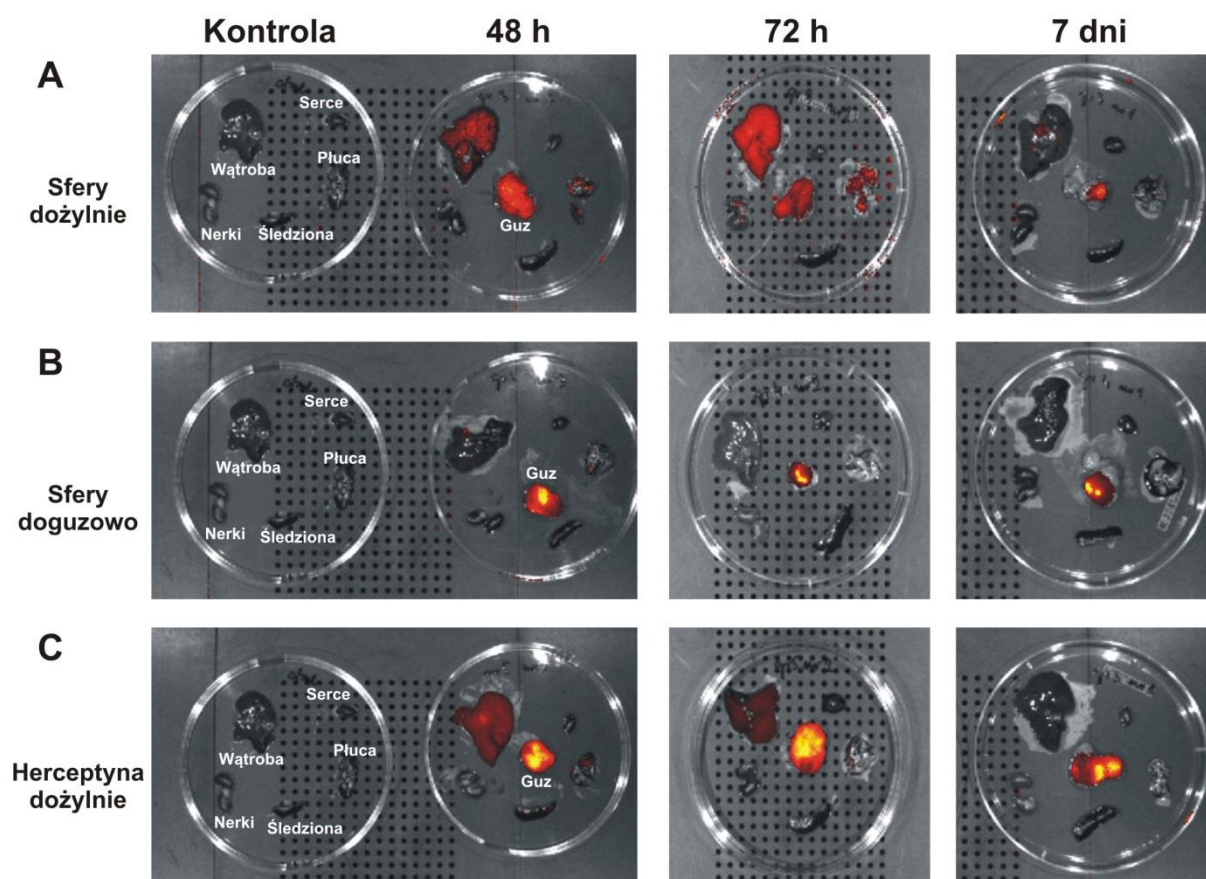
Ryc. 53 Biodystrybucja jedwabnych sfer po podaniu dożylnym myszom z rozwiniętym guzem. (A) Obrazowanie guzów D2F2/E2/LUC po 14 dniach od podskórnego podania 1 mln komórek/mysz. Następnie myszom podawano 2-krotnie funkcjonalizowane sfery H2.1MS1 (100 μ g/mysz) dożylnie lub w miejsce guza oraz grupie kontrolnej dożylnie herceptynę (1 μ g/mysz). Obrazowanie sfer po 24 godz. od (B) pierwszego oraz (C) drugiego podania. W każdej grupie kontrolę stanowiła mysz, która nie otrzymała sfer. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer i herceptyny wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N oraz w module luminescencji dla detekcji guzów. Stosowano jednakowe parametry.

Analiza dystrybucji funkcjonalizowanych sfer H2.1MS1 po trzecim podaniu dożylnym wykazała akumulację sfer w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie. Ponadto, sfery były widoczne prawdopodobnie również w płucach (do 1 godz. od podania sfer) i w wątrobie. W miarę upływu czasu sygnał w guzach był nadal widoczny, podczas gdy sygnał w pozostałych narządach zanikał (Ryc. 54 A, B).



Ryc. 54 Biodystrybucja jedwabnych sfer H2.1MS1 w czasie po podaniu dożylnym. Sfery obrazowano w różnych punktach czasowych od momentu trzeciego podania dożylnego (100 μg /mysz). (A) Zdjęcia sfer wykonane w pozycji bocznej. (B) Zdjęcia sfer wykonane gdy myszy znajdowały się w pozycji grzbietowej. W każdym punkcie czasowym kontrolę stanowiła mysz, która nie otrzymała sfer. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

U myszy, które otrzymały sfery dożylnie, sygnał emitowany przez sfery był widoczny w guzie 48 godz. oraz 72 godz. po podaniu (Ryc. 55 A). W tych punktach czasowych obserwowano również sfery zakumulowane w płucach i wątrobie. Jednakże, po 7 dniach od podania sygnał w narządach był niewykrywalny, natomiast nadal utrzymywał się w guzie. Nie wykazano sygnału sfer w narządach myszy po ich doguzowym wstrzyknięciu (Ryc. 55 B). Ponadto, w grupie kontrolnej herceptyna oprócz akumulacji w guzie gromadziła się również w wątrobie (Ryc. 55 C). Sygnał obserwowany w wątrobie stopniowo zanikał – po 7 dniach był niewykrywalny. Natomiast po 7 dniach obserwacji sygnał obecny w guzie był nadal bardzo intensywny.



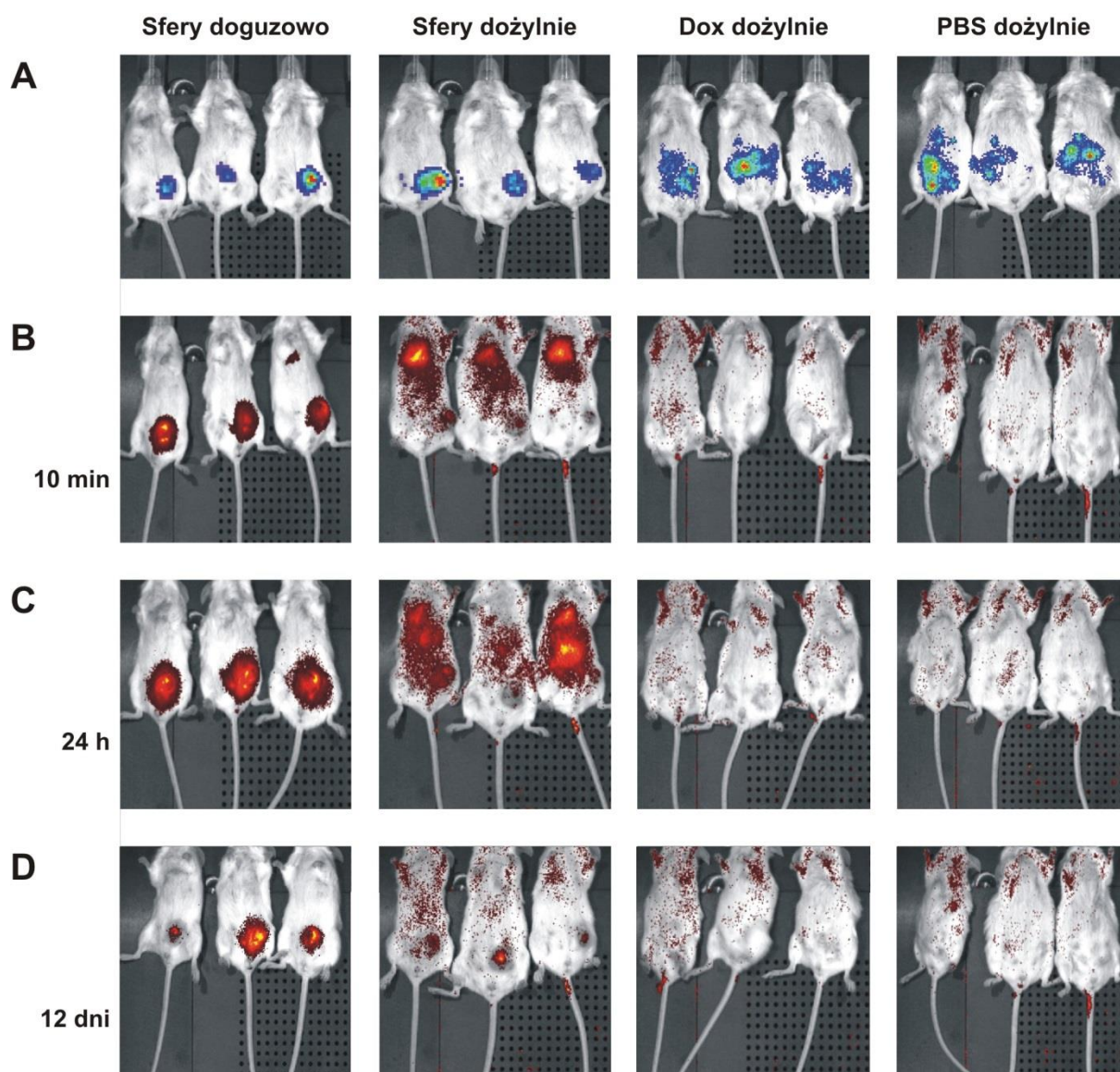
Ryc. 55 Dystrybucja jedwabnych sfer H2.1MS1 i herceptyny po trzecim podaniu w izolowanych narządach i guzach: (A) dożylnym sfer H2.1MS1 (100 $\mu\text{g}/\text{mysz}$), (B) doguzowym sfer H2.1MS1 (100 $\mu\text{g}/\text{mysz}$), (C) dożylnym herceptyny (5 $\mu\text{g}/\text{mysz}$). Kontrolę stanowiła mysz, która nie otrzymała sfer. Obrazowano następujące narządy: serce, płuca, nerki, wątrobę, śledzionę oraz guzy. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer oraz herceptyny wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

4.23.2.3 Dystrybucja sfer niosących Dox w mysim modelu raka piersi

Myszom podano podskórnie komórki D2F2/E2/LUC (Her2-pozytywne). Po 14 dniach u myszy stwierdzono uformowanie guza (Ryc. 56 A). Po tym czasie, myszom 3-krotnie (w 0, 3 i 6 dniu eksperymentu) podano dożylnie lub doguzowo sfery z Dox. Kontrolę stanowiły grupy otrzymujące 3-krotnie niskocząsteczkową Dox oraz PBS.

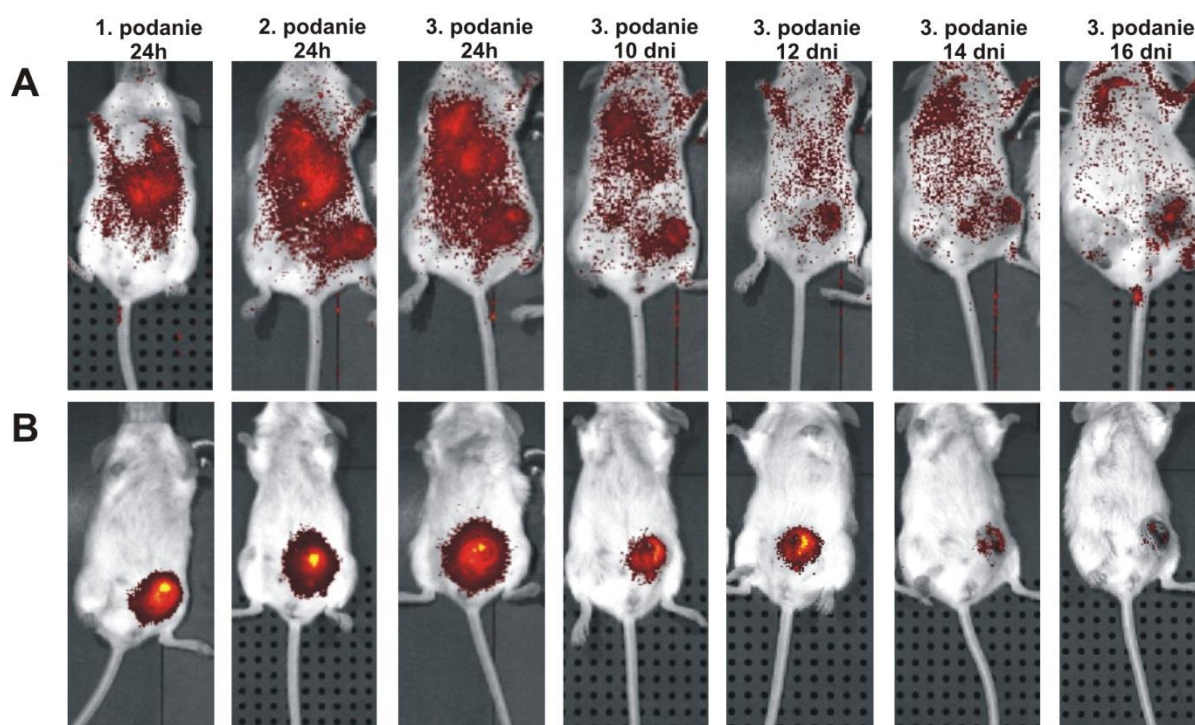
10 min. po trzecim dożylnym podaniu sfer obserwowano sygnał fluorescencyjny w płucach oraz sygnał w guzie zakumulowany po dwóch pierwszych podaniach (Ryc. 56 B). 24 godz. po dożylnym podaniu wykazano akumulację sfer H2.1MS1 ładowanych Dox w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie. Oprócz guzów sygnał obserwowano także w narządach – prawdopodobnie w wątrobie i płucach (Ryc. 56 C). Natomiast w 12 dniu eksperymentu, nie

obserwowano fluorescencji w narządach, natomiast uzyskano detekcję sygnału w guzie (Ryc. 56 D). Po doguzowej iniekcji sfer wykazano sygnał fluorescencyjny w guzie utrzymujący się do 12 dnia eksperymentu, przy czym jego intensywność malała w czasie (Ryc. 56 B-D).



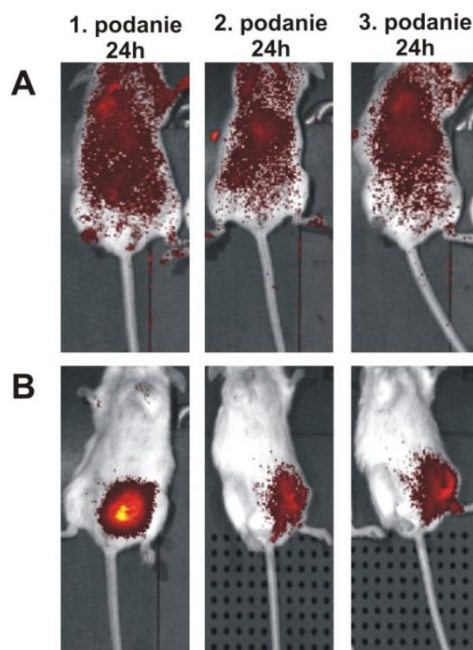
Ryc. 56 Biodystrybucja w czasie sfer H2.1MS1-Dox (5 mg Dox/kg m.c.) podanych doguzowo lub dożylnie. (A) Obraz guzów D2F2/E2/LUC po 14 dniach od podskórnego podania 1 mln komórek/mysz oraz (B) 10 min., (C) 24 godz. i (D) 12 dni od chwili trzeciego podania sfer, niskocząsteczkowej Dox lub PBS. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

Analiza długotrwałej dystrybucji po trzecim dożylnym i doguzowym podaniu sfer ładowanych lekiem w czasie do 16 dni od momentu iniekcji wykazała, iż wraz z czasem u myszy otrzymujących sfery z Dox dożylnie wzrastał sygnał fluorescencyjny w guzie w stosunku do intensywności fluorescencji pochodzącej z narządów (Ryc. 57 A). Akumulacja sfer w guzie utrzymywała się do 16 dnia trwania eksperymentu. Natomiast w przypadku myszy, którym podawano sfery doguzowo wykazano intensywny sygnał fluorescencyjny w miejscu guza, który stopniowo zanikał (Ryc. 57 B).



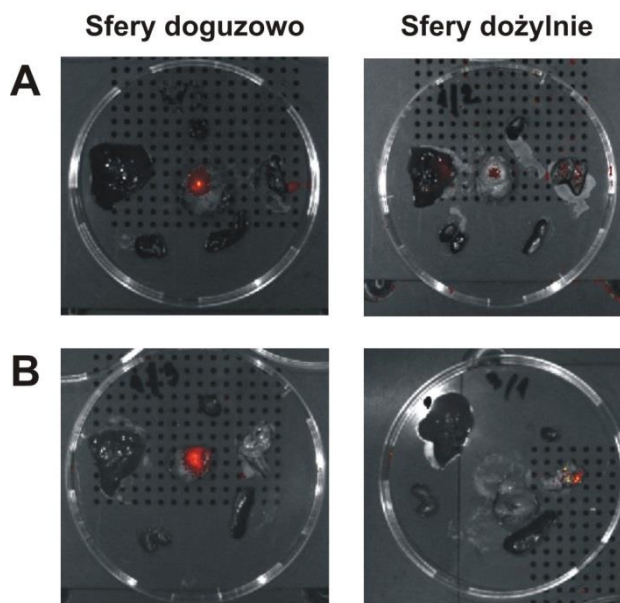
Ryc. 57 Biodystrybucja jedwabnych sfer H2.1MS1 ładowanych Dox po podaniu (A) dożylnym oraz (B) doguzowym. Sfery H2.1MS1-Dox w dawce 5 mg Dox/kg m.c. podawano myszom z rozwiniętymi guzami Her2-pozytywnymi D2F2/E2/LUC 3-krotnie. Sfery obrazowano w różnych punktach czasowych: 24 godz. od pierwszego podania, 24 godz. od drugiego podania, 24 godz. oraz 10 dni, 12 dni, 14 dni, 16 dni od momentu trzeciej iniekcji. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

Nie zaobserwowano akumulacji funkcjonalizowanych sfer w guzach uformowanych przez komórki Her2-ujemne D2F2/LUC po podaniu dożylnym (Ryc. 58 A), podczas gdy gromadziły się w innych narządach, prawdopodobnie w płucach i wątrobie. Po doguzowej iniekcji sfer wykazano sygnał fluorescencyjny w guzie (Ryc. 58 B).



Ryc. 58 Biodystrybucja jedwabnych sfer H2.1MS1 łaadowanych Dox po podaniu (A) dożylnym oraz (B) doguzowym. Sfery H2.1MS1-Dox w dawce 5 mg Dox/kg m.c. podawano myszom z rozwiniętymi guzami Her2-negatywnymi D2F2/LUC 3-krotnie. Sfery obrazowano w różnych punktach czasowych: 24 godz. od pierwszego podania, 24 godz. od drugiego podania oraz 24 godz. od momentu trzeciej iniekcji. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

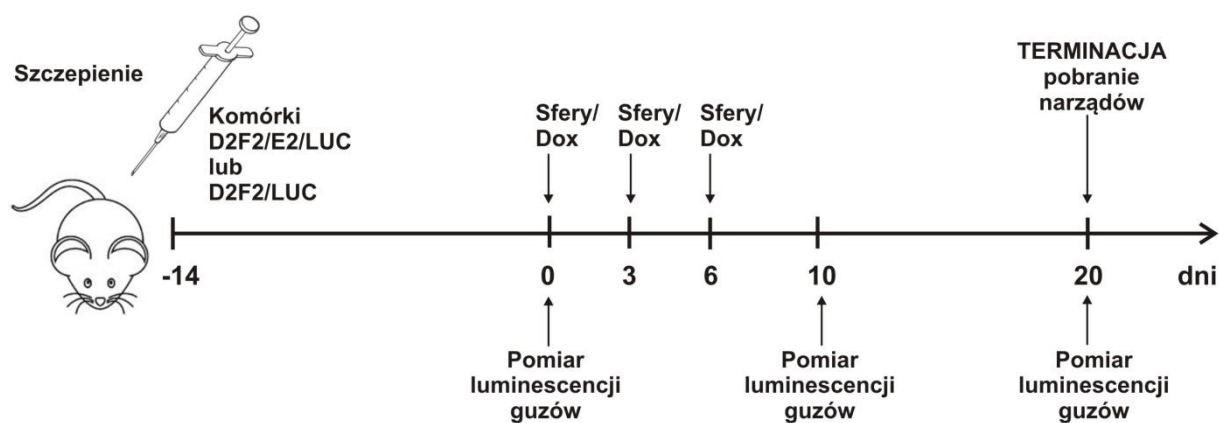
W 20 dniu eksperymentu zarówno u myszy z nowotworem D2F2/E2/LUC, jak i kontrolnym D2F2/LUC nie stwierdzono akumulacji sfer w narządach po podaniu dożylnym (Ryc. 59 B) i doguzowym (Ryc. 59 A). Dla obu typów guzów obserwowano jednak szczątkową akumulację sfer w guzie po podaniu doguzowym (Ryc. 59 A).



Ryc. 59 Narządów pozyskane od myszy z rozwiniętymi guzami (A) D2F2/LUC oraz (B) D2F2/E2/LUC w 20 dniu leczenia (koniec eksperymentu i terminacja myszy). Oceniano biodystrybucję sfer H2.1MS1-Dox podanych doguzowo oraz dożylnie w dawce 5 mg Dox/kg m.c. Obrazowano następujące narządy: serce, płuca, nerki, wątrobę, śledzionę oraz guzy. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum przy długości fali wzbudzenia 640 nm i długości fali emisji 680 nm, wykorzystując fluorescencję sfer wyznakowanych fluoroforem ATTO 647N i stosując jednakowe parametry.

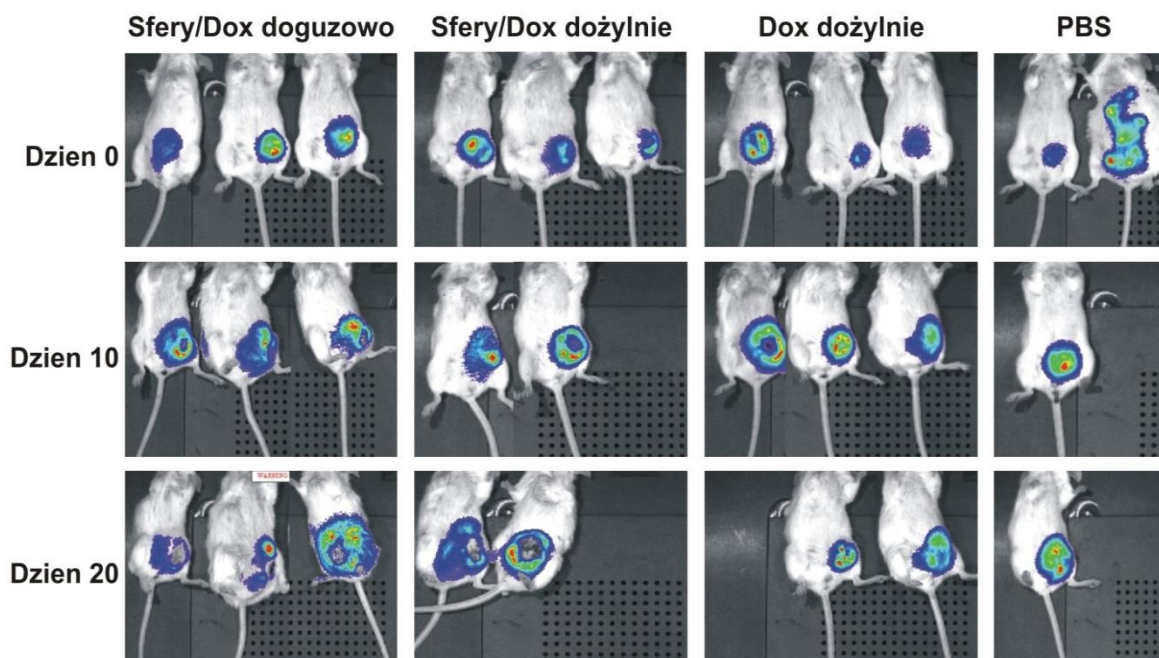
4.23.2 Terapia

Ocenę działania przeciwnowotworowego Dox dostarczanego w sferach dokonano w mysim modelu eksperymentalnym. Myszom podano podskórnie komórki mysiego raka piersi D2F2/E2/LUC i D2F2/LUC, a po upływie 14 dni od momentu podania komórek, gdy guzy osiągnęły średnio rozmiar 50– 100 mm³ rozpoczęto terapię. Rycina 60. przedstawia schematyczny przebieg leczenia.



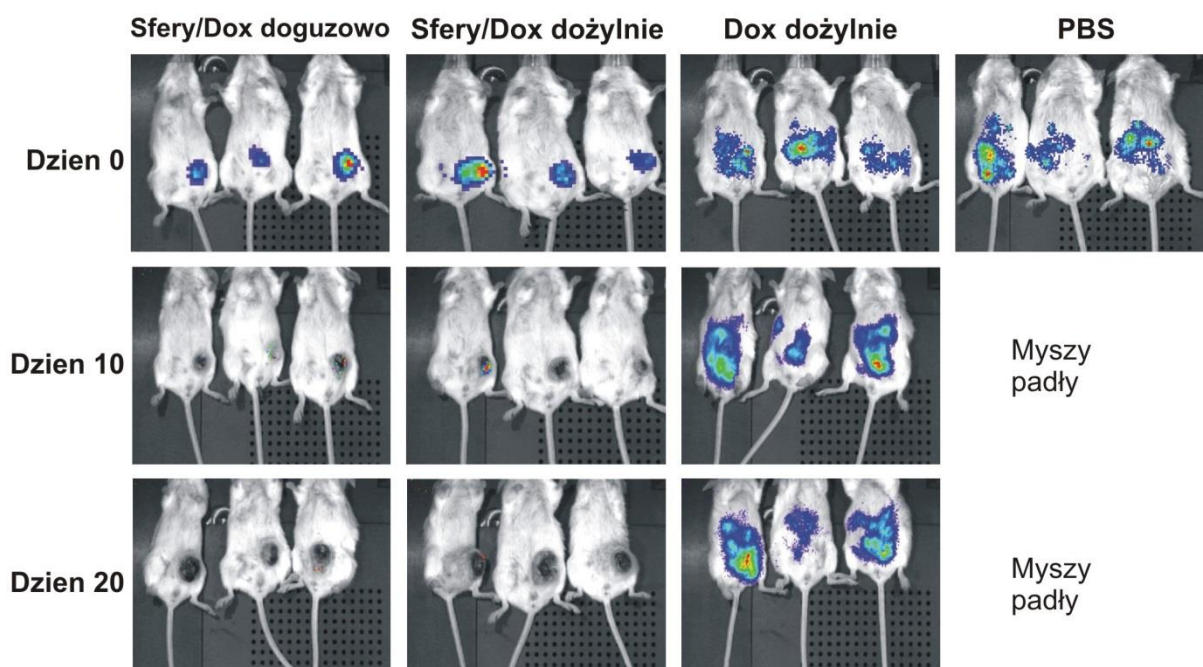
Ryc. 60 Schematyczny plan leczenia i oceny efektu terapeutycznego w modelu zwierzęcym.

Oceny działania przeciwnowotworowego Dox dostarczanej w sferach dokonano poprzez porównywanie rozmiaru guzów D2F2/E2/LUC i D2F2/LUC do 20 dnia leczenia. Grupy kontrolne stanowiły myszy otrzymujące PBS i niskocząsteczkową Dox w stężeniu 5 mg/kg m.c. Grupom badanym sfery podawano dożylnie i doguzowo w stężeniu Dox odpowiadającym 5 mg/kg m.c.



Ryc. 61 Guzy Her2-negatywne D2F2/LUC w grupach badanych otrzymujących doguzowo i dożylnie sfery H2.1MS1-Dox oraz w grupach kontrolnych, którym podawano dożylnie Dox lub PBS. Obrazowanie guzów wykonano przed rozpoczęciem leczenia (dzień 0) oraz w 10 i 20 dniu leczenia. W celu obrazowania intensywności luminescencji guzów myszom podano 200 μ l lucyferyny (15 mg/ml). Detekcję bioluminescencji przeprowadzono stosując aparat do obrazowania molekularnego zwierząt IVIS[®] Spectrum oraz jednakowe parametry.

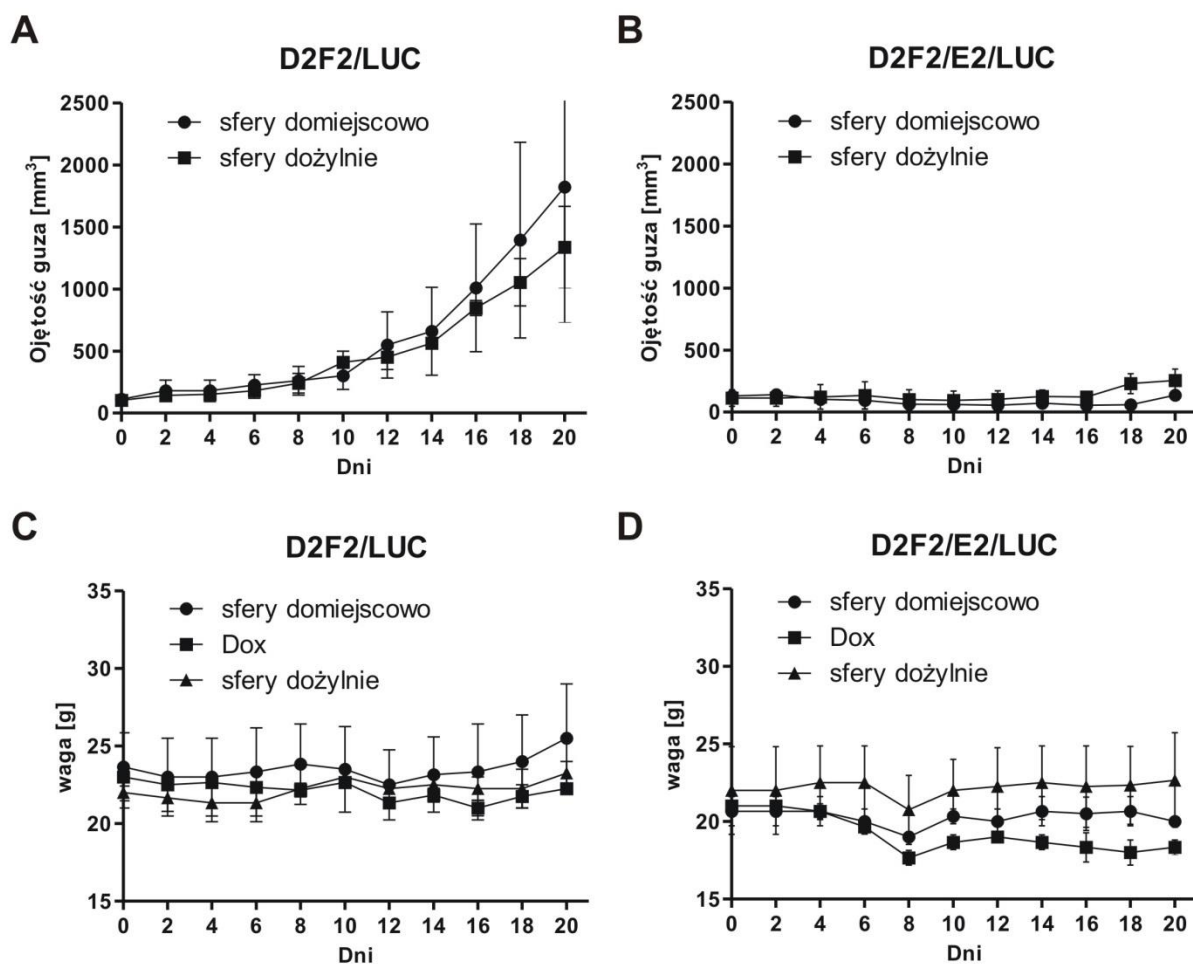
Zaobserwowano różnice w ilości żywych komórek dwóch typów nowotworów w 10 i 20 dniu leczenia (Ryc. 61 i Ryc. 62). U myszy otrzymujących Dox dostarczana swoiście w sferach, komórki D2F2/E2/LUC były martwe (brak sygnału luminescencyjnego) (Ryc. 62 A, B), podczas gdy komórki D2F2/LUC wykazywały aktywność metaboliczną (Ryc. 61 A, B) i sygnał luminescencyjny był bardziej intensywny w porównaniu z dniem rozpoczęcia eksperymentu. W grupach kontrolnych otrzymujących PBS i wolną Dox obserwowano wzrost intensywności sygnału do ostatniego dnia eksperymentu, zarówno w nowotworach D2F2/LUC (Ryc. 61 C, D), jak i D2F2/E2/LUC (Ryc. 62 C, D). W niektórych przypadkach postęp choroby nowotworowej prowadził do śmierci myszy.



Ryc. 62 Efekt terapeutyczny sfer dostarczających Dox do guzów. Myszy z guzami Her2-pozytywnymi D2F2/E2/LUC w grupach badanych otrzymały doguzowo i dożylnie sfery H2.1MS1-Dox oraz w grupach kontrolnych, którym podawano dożylnie Dox lub PBS. Obrazowanie guzów wykonano przed rozpoczęciem leczenia (dzień 0) oraz w 10 i 20 dniu leczenia. W celu obrazowania intensywności luminescencji guzów myszom podano 200 μ l lucyferyny w stężeniu 15 mg/ml. Detekcję bioluminescencji przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia do obrazowania molekularnego zwierząt laboratoryjnych IVIS[®] Spectrum stosując jednakowe parametry.

U myszy z guzami Her2-dodatnimi (D2F2E2/LUC), które otrzymywały swoiste dla tego nowotworu leczenie w postaci funkcjonalizowanych sfer ładowanych Dox wzrost guza

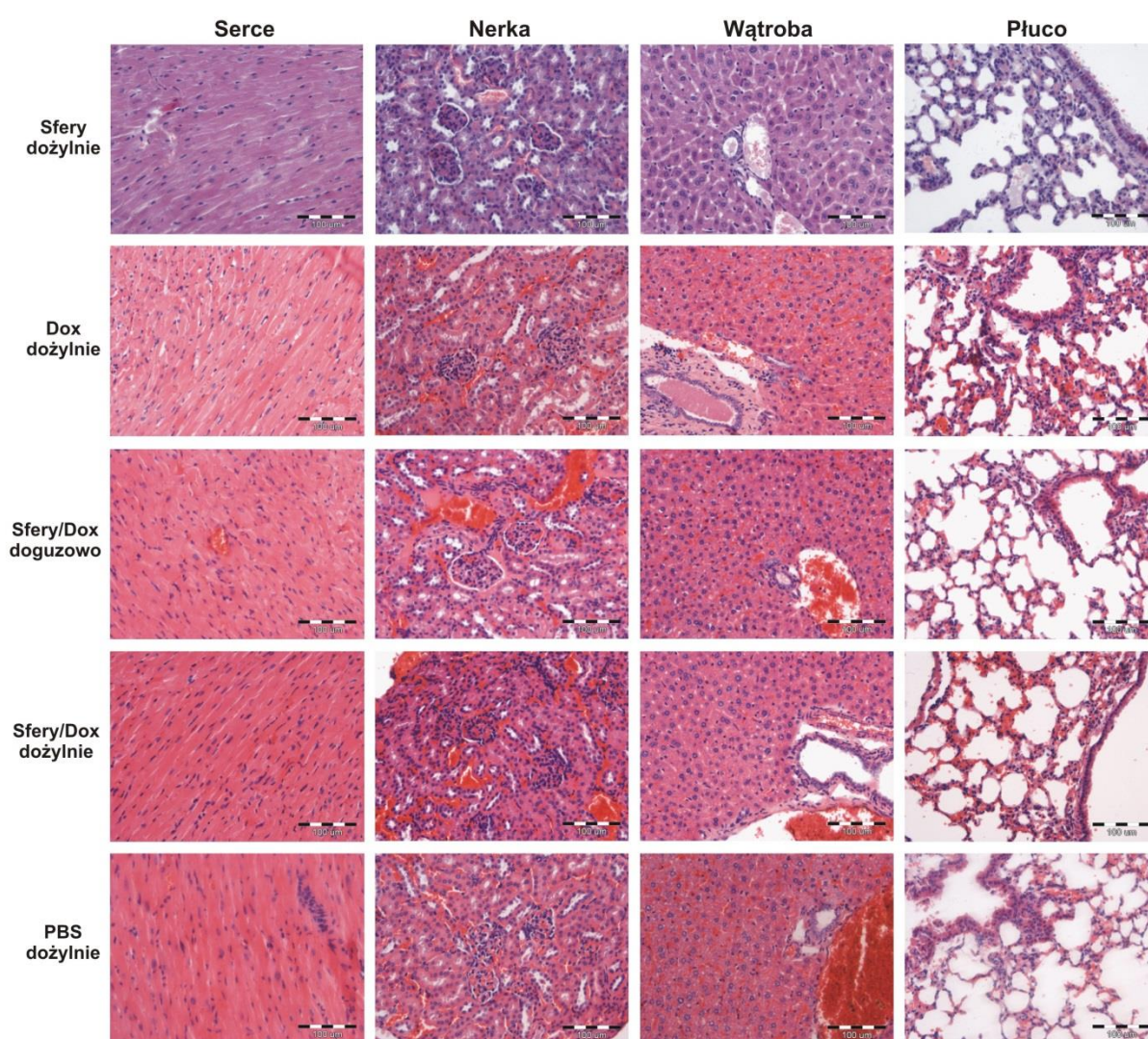
był zahamowany (Ryc. 63 B), podczas gdy u myszy kontrolnych z guzami Her2-ujemnymi (D2F2/LUC) guzy wzrastały do ostatniego dnia eksperymentu pomimo stosowanego leczenia (Ryc. 63 A).



Ryc. 63 Kinetyka wzrostu guzów (A) D2F2/LUC i (B) D2F2/E2/LUC oraz waga myszy (C) D2F2/LUC i (D) D2F2/E2/LUC. Parametry monitorowano przed 20 dni stosowanego leczenia.

Wykazano brak istotnych statystycznie różnic wagi myszy w zależności od stosowanego leczenia w obu typach nowotworów (Ryc. 63 C, D). Zaobserwowano jednak, że myszy otrzymujące niskocząsteczkową Dox miały niższą wagę w porównaniu z grupami którym podawano Dox uwięziony w sferach, zarówno u myszy D2F2/E2/LUC (ryc. 63 D), jak i D2F2/LUC (Ryc. 63 C).

Analiza histopatologiczna wykazała brak ogólnoustrojowej toksyczności (Ryc. 65). Mysiom podawano sfery bez leku, sfery ładowane Dox, wolną dokсорubicynę lub PBS. Niezależnie od podawanego leczenia, nie obserwowano zmian makroskopowych w badanych narządach, a mianowicie w sercu, nerkach i płucach (Ryc. 65). Natomiast w wątrobie obserwowano atypowe zmiany makroskopowe, stanowiące prawdopodobnie skupiska limfocytarne. Skupiska były widoczne w przypadku wszystkich analizowanych czynników, jednakże występowały w większej ilości w grupach otrzymujących dożylnie sfery w porównaniu z grupami kontrolnymi.



Ryc. 65 Obraz histopatologiczny narządów po podaniu sfer (dożylnie), wolnej Dox (dożylnie), sfer ładowanych Dox (doguzowo), sfer ładowanych Dox (dożylnie) oraz kontrolnie PBS (dożylnie). Zdjęcia przedstawiają barwienie H+E (hematoksylina-eozyna) głównych narządów: serce, nerki, wątroba oraz płuca. Skala: 100 μm.

5. Dyskusja

Głównym wyzwaniem w chemioterapii nowotworów jest zwiększenie efektów terapeutycznych i zminimalizowanie skutków ubocznych stosowanych leków. Upakowanie leków do nanocząstek transportujących zmienia ich farmakokinetykę, zarówno wewnątrzkomórkową jak i ich dystrybucję *in vivo* [50, 54]. W guzach litych, nieszczelne naczynia krwionośne i upośledzony drenaż limfatyczny guza umożliwiają pasywną akumulację nanocząstek w tkance nowotworowej. Efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR) jest często czynnikiem kluczowym, który pozwala na bierne kierowanie nanoosiłników właśnie w miejsce guza [68]. Jednak identyfikacja i wprowadzenie czynników kierujących do komórek nowotworowych jest niezbędne do realizacji skuteczniejszej terapii. Jednym z obiecujących podejść do leczenia raka jest stosowanie funkcjonalizowanych ligandem systemów dostarczania leków, które rozpoznają docelowe komórki nowotworowe [51, 254].

W niniejszej pracy doktorskiej zaprezentowano nowatorski system dostarczania substancji aktywnych do komórek nowotworowych, oparty na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczego. Udowodnieniem koncepcji i możliwości systemu są otrzymane główne wyniki: (i) funkcjonalizowane bioinżynierowane białka jedwabiu mogą być produkowane w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i mogą być oczyszczane metodami opartymi na właściwościach naturalnego jedwabiu pajęczego, bez wprowadzania dodatkowych sekwencji ułatwiających oczyszczanie białka, (ii) wyselekcjonowane peptydy wiążące receptor (H2.1 oraz H2.2) przyłączone do jedwabnej sekwencji bez dodatkowego łącznika peptydowego zachowują swoją funkcjonalność, (iii) domeny funkcyjne nie zmieniają właściwości białek jedwabiu do samoorganizacji i nie zakłócają procesu wytwarzania sfer, (iv) właściwości fizyczne jedwabnych nośników można łatwo kontrolować poprzez mieszanie dwóch różnych bioinżynierowanych białek jedwabiu w odpowiednim stosunku wagowym, (v) funkcjonalizowane jedwabne sfery wiążą się i ulegają internalizacji do komórek docelowych z nadekspresją Her2, (vi) funkcjonalizowane jedwabne sfery ładowane lekiem skutecznie zabijają docelowe komórki nowotworowe, (vii) funkcjonalizowane sfery wykazują swoistą akumulację w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie, oraz (viii) doksorubicyna dostarczana w sferach wykazuje efekt terapeutyczny w stosowanym modelu *in vivo*.

Obecnie poszukiwane są nowe cząstki, które rozpoznają determinanty nowotworowe, umożliwiając w ten sposób bezpośrednie dostarczanie leków swoiście do komórek nowotworowych [85, 255]. Podejście ukierunkowanego dostarczania jest atrakcyjne, gdyż reprezentuje niektóre z zalet miejscowego stosowania leków, tj. wysokie stężenie lokalne i niską ekspozycję ogólnoustrojową. Choroby nowotworowe wyróżniają się spośród innych chorób, jako że mogą w największym stopniu korzystać z ukierunkowanej terapii. Na powierzchni komórek nowotworowych ulegają nadekspresji cząsteczki lub antygeny, które odróżniają je od normalnych komórek [256, 257]. Her2 jest członkiem rodziny receptorów naskórkowych czynników wzrostu, których zwiększona komórkowa ekspresja jest związana z progresją nowotworu [258]. Receptor Her2 ulega nadekspresji w wielu rodzajach nowotworów, w tym ludzkim raku piersi, raku jajnika i raku prostaty [17]. Jednocześnie, receptor ten nie ulega ekspresji na poziomie wykrywalności w zdrowych tkankach ludzkich. Powszechnie Her2 wykrywa się stosując przeciwciała monoklonalne. Trastuzumab (Herceptin[®]) był pierwszym przeciwciałem terapeutycznym stosowanym klinicznie do leczenia przerzutowego raka piersi [36]. Biorąc pod uwagę częstość występowania nadekspresji receptora Her2 w nowotworach piersi i jajnika, uzasadnionym jest projektowanie ukierunkowanych środków terapeutycznych opartych na koniugatach z przeciwciałem monoklonalnym anti-Her2. Do tej pory zbadano liczne systemy, między innymi liposomy, funkcjonalizowane przeciwciałem anti-Her2, jako nanocząstki dostarczające leki do komórek nowotworowych [259]. Mimo, że przeciwciała monoklonalne wykazują korzyści kliniczne jako środki przeciwnowotworowe, ich potencjał stosowania jako system dostarczania leków jest ograniczony ze względu na szereg czynników, w tym dużą wielkość molekuł, słabą penetrację nowotworu i wysoką immunogenność [260]. Istnieją doniesienia dotyczące strategii użycia Her2-swoistych cząsteczek typu affibody sprzężonych z liposomami [41, 261] lub nanokapsułkami [262], zapewniającej poprawę dostarczania leków przeciwnowotworowych w sposób swoisty dla komórek docelowych. Ponadto, peptydy kierujące specyficznym do nowotworów oferują atrakcyjną alternatywę dla przeciwciał i fragmentów przeciwciał ze względu na ich niewielkie rozmiary i właściwości farmakokinetyczne *in vivo* [259]. Peptydy, które wiążą się swoiście do antygenów nowotworowych mogą być połączone z nośnikiem w celu selektywnego dostarczania środków chemioterapeutycznych do komórek nowotworowych. Ta charakterystyka pozwoliła wybrać domeny wiążące Her2, (i) peptyd MYWGDSHWLQYWYE [252], w tym badaniu nazwany H2.1, oraz (ii) peptyd LTVSPWY [263], o nazwie H2.2, kierujące do Her2-dodatnich komórek nowotworowych.

Białko jedwabiu pajęczego użyte do wytwarzania sfer funkcjonalizowano dwoma peptydami wiążącymi Her2. Wcześniej wykazano, że peptydy H2.1 i H2.2 ulegają internalizacji do komórek po związaniu się z receptorem. Peptydy H2.1 i H2.2 przyłączono na N- lub C-końcu sekwencji białka jedwabiu za pomocą krótkiego łącznika (dwa aminokwasy, które wywodzą się z miejsca restrykcyjnego) w celu zminimalizowania pustych sekwencji. Eksperymenty wiązania białek MS1 w formie rozpuszczalnej wykazały, że utworzenie białek fuzyjnych nie zakłóciło aktywności domen H2.1 i H2.2. Ponadto zaobserwowano, że N-końcowa modyfikacja zapewnia wyższy poziom wiązania w porównaniu z wariantami białka fuzyjnego z C-końcową funkcjonalizacją. Shadidi i Sioud (2003) otrzymali funkcjonalne białka hybrydowe poprzez przyłączenie peptydu H2.2 na C-końcu białka GFP przez zastosowanie łącznika o długości trzech aminokwasów (GGG) [253]. Prawdopodobnie dla C-końcowej funkcjonalizacji jedwabiu jest potrzebny dłuższy łącznik dla zachowania pełnej możliwości wiązania peptydu fuzyjnego.

Wyniki przedstawione w rozprawie wskazują, że peptydy funkcyjne mogą być przyłączone do bioinżynierowanych białek jedwabiu. Białka fuzyjne mogą posłużyć do produkcji sfer i taki system może zostać wykorzystany jako system celowanego dostarczania leków. Numata i wsp. zaproponowali kompleksy oparte na jedwabiu ze swoistymi peptydami rozpoznającymi komórki nowotworowe jako układ dostarczania genów [220, 221]. Choć podstawowa koncepcja stosowania funkcjonalizowanych białek jedwabiu jest podobna, w opisywanym projekcie doktorskim skupiono się na zaprojektowaniu systemu opartego na funkcjonalizowanym jedwabiu zawierającym możliwie najkrótszą nadmiarową sekwencję. Celem było wykorzystanie naturalnych właściwości jedwabiu do oczyszczania białka, a także zdolność jedwabiu do przyjmowania określonych struktur morfologicznych (jak sfery, filmy, rusztowania itp.). Wprowadzona obca sekwencja może bowiem upośledzać nie tylko właściwości jedwabiu, ale również powodować toksyczność i immunogenność, które mają ogromne znaczenie dla zastosowań *in vivo*. Dlatego też, domeny funkcyjne powinny być tak krótkie, jak to tylko możliwe.

Obecnie są prowadzone intensywne badania nad rozwojem różnych systemów ukierunkowanego dostarczania substancji czynnych do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych. Testowano liczne systemy nanocząsteczkowe w układach modelowych i w badaniach klinicznych [10, 64, 119]. Do wytwarzania nanocząsteczkowych systemów dostarczania można stosować zarówno materiały naturalne, jak i syntetyczne. Najczęściej stosowanymi są syntetyczne polimery biodegradowalne, takie jak poliestry i polibezwodniki

[264]. W niektórych przypadkach można kontrolować degradację tych polimerów, a także regulować takie czynniki jak masa cząsteczkowa, stosunek między różnymi monomerami lub kopolimerami oraz stopień krystaliczności. Jednak większość stosowanych polimerów ma poważne ograniczenia, do których zaliczamy właśnie brak biodegradacji nośnika, i niestabilność substancji aktywnej w nośniku [265]. Ponadto, ze względu na ich hydrofobowy charakter, polimery muszą być rozpuszczane w rozpuszczalnikach organicznych, które często mogą być szkodliwe dla leków białkowych oraz toksyczne dla organizmu. Dodatkowo, produkty degradacji nośników syntetycznych mają odczyn kwaśny, co może powodować denaturację leków białkowych i utratę ich aktywności biologicznej [60]. W porównaniu z polimerami syntetycznymi, polimery pochodzenia naturalnego takie jak kolagen, żelatyna, kwas hialuronowy, celuloza, alginian lub chitosan, ulegają degradacji oraz charakteryzują się dobrą biokompatybilnością [264, 265]. Przeszkody w wykorzystywaniu polimerów naturalnych dla zastosowań biomedycznych są zwykle związane z trudnością uzyskania powtarzalnych jakościowo cząstek oraz niekontrolowaną szybkością ich degradacji. Dlatego pożądane jest opracowanie systemu dostarczania, który może być podawany dożylnie, jest biodegradowalny i zdolny do dostarczania istotnych klinicznie środków chemioterapeutycznych. Wykazano, że nanosfery oparte na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczego, wytwarzane w łatwym i tanim procesie produkcji z uzyskaniem materiału o powtarzalnych właściwościach, mogą być ładowane lekami. Dodatkowo, możliwość ich funkcjonalizacji czyni je potencjalnymi nośnikami substancji aktywnych do celowanej terapii nowotworów [220, 266, 267].

Wiele uwagi poświęca się białkom jedwabiu pajęczego, ze względu na ich wyjątkowe właściwości, takie jak doskonała stabilność mechaniczna, biokompatybilność i zdolność do zrównoważonej degradacji, czym przewyższają inne syntetyczne i naturalne materiały [60, 268, 269]. Szeroko zróżnicowane potencjalne zastosowania jedwabiu obejmują również pierwsze próby ich wykorzystania do leczenia nowotworów. Można tu wymienić samoagregujące jedwabne hydrożele do miejscowego dostarczania leków przeciwnowotworowych [250], jedwabne filmy do ogniskowej terapii raka piersi [249] czy nanocząsteczki reagujące na temperaturę do celowanego dostarczania leku [270]. Jednakże wszystkie te biomedyczne aplikacje zostały oparte na naturalnych białkach jedwabiu uzyskanych z jedwabnika morwowego *B. mori*. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że sfery wytworzone z genetycznie inżynierowanych białek jedwabiu pajęczego są obiecującymi nośnikami do selektywnego dostarczania leków do komórek.

Wcześniej wykazano, że metoda oczyszczania bioinżynierowanego 15meru białka jedwabiu pajęczego (MS1) polegająca na denaturacji termicznej umożliwiła uzyskanie nietoksycznych, nieimmunogennych i wolnych od endotoksyn białek jedwabiu [200]. W związku z powyższym, w tym projekcie doktorskim dotyczącym funkcjonalizowanych wariantów jedwabiu pajęczego, zastosowano tą samą metodę oczyszczania. W celu stworzenia innowacyjnego systemu wykorzystano bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego funkcjonalizowane opisanymi powyżej peptydami rozpoznającymi Her2. Koniecznym etapem badań była ocena, czy przyłączone domeny funkcyjne wpływają na właściwości jedwabiu. Wysokie stężenie fosforanu potasu powoduje samoorganizację pajęczych białek co skutkuje wytworzeniem sfer [242]. Sfery wykonane z białek kontrolnych oraz wariantów jedwabiu z grupami funkcyjnymi wykazywały podobną morfologię, co wskazuje, że domeny wiążące receptor nie zakłócały właściwości jedwabiu do samoorganizacji i tworzenia sfer w obecności jonów fosforanowych.

Do tej pory, najbardziej aktualne badania dotyczące sfer opartych na pajęczych spidroinach koncentrowały się na technikach ich przygotowania. Slotta i wsp. (2008) wykazali, że białka jedwabiu samoorganizują się w obecności fosforanu potasu o stężeniu nie mniejszym niż 400 mM. Jednakże, Lammel i wsp. (2010) zasugerowali, że jedwabne sfery mogą zostać utworzone z zastosowaniem nie mniej niż 0,75 M roztworu fosforanu potasowego. Stężenie białka i fosforanu potasu, a także sposób mieszania mają wpływ na morfologię i rozmiar sfer [241, 242]. Wytwarzanie sfer przy niskim stężeniu jedwabiu i wysokim stężeniu fosforanu potasu za pomocą mieszania pipetą skutkowało tworzeniem cząsteczek o średnicy 350-510 nm, w zależności od stężenia białka. Jednakże otrzymane cząsteczki miały szeroki zakres rozmiarów [242]. W badaniach zawartych w projekcie doktorskim, jedwabne sfery wytwarzano przez wysalanie w obecności 2 M roztworu fosforanu potasu (pH 8,0). Wytwarzanie sfer za pomocą mieszania przy użyciu pipety z jedwabnych białek MS1, H2.1MS1 i H2.2MS1 w stężeniu 0,5 mg/ml doprowadziło do powstania cząstek o przybliżonych średnich rozmiarach 400 nm. Potwierdzono kulisty kształt cząstek metodą skaningowej mikroskopii elektronowej, jednak, podobnie jak Lammel A. i wsp (2008), obserwowano szeroki rozkład wielkości cząstek. Zastosowanie systemu mikromieszania w warunkach wysokiego ciśnienia powinno poprawić morfologię sfer w odniesieniu do ich rozmiaru i rozkładu wielkości [242]. Ponadto, zastosowanie membran o określonej wielkości porów do ultrafiltracji jest kolejną metodą umożliwiającą uzyskiwanie jednolitych sfer [270]. Wielkość nośników leków odgrywa kluczową rolę w ich profilu

farmakokinetycznym – im większe nanocząstki, tym wyższe prawdopodobieństwo ich eliminacji przez makrofagi [271]. Wiadomo, że nanocząstki większe niż 300 nm aktywują układ dopełniacza i są usuwane z krwioobiegu [272]. Ponadto, endocytoza będąca główną metodą absorpcji cząstek faworyzuje te o rozmiarach od 80 nm do 150 nm [273]. Biorąc pod uwagę wymienione czynniki, istnieje zapotrzebowanie na optymalizację techniki wytwarzania sfer w celu uzyskania możliwie małych rozmiarów oraz jednolitych cząstek, optymalnie w zakresie 10 – 100 nm.

Uzyskane sfery oparte na białkach MS1 miały tendencję do tworzenia agregatów. Inne grupy badały właściwości cząstek produkowanych w oparciu o bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego eADF4(C16) pochodzące od pająka *A. diadematus* [241, 242, 274]. Uzyskano sfery o lepszej dyspersji, co było uwarunkowane niskim punktem izoelektrycznym stosowanego białka wynoszącym 3,48 [274]. Bioinżynierowane białko eADF4(C16) jest analogiem drugiego analizowanego białka pochodzącego od pająka *N. clavipes* – MS2. Wykazano, że sfery oparte na rekombinowanym białku jedwabiu pajęczego MS2 charakteryzowały się większą stabilnością i lepszą morfologią. Były one mniejsze, bardziej regularne i nie miały tendencji do agregacji. Jednakże, prawdopodobnie ze względu na ujemny potencjał dzeta funkcjonalizowane sfery MS2 utraciły zdolność wiązania do komórek. Dlatego, w oparciu o dostępną wiedzę i w celu optymalizacji właściwości fizycznych sfer i ich aktywności biologicznej, w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę produkowania sfer z mieszanym białek MS1 i MS2.

Skuteczne stosowanie Her2-ukierunkowanych nanosfer będzie zależeć od ich swoistych interakcji z receptorami komórkowymi, a następnie ich wewnątrzkomórkowej internalizacji i gromadzenia w lizosomach. Dlatego oceniano wiązanie jedwabnych sfer kontrolnych i funkcjonalizowanych do komórek Her2-dodatnich SKOV3 i SKBR3 w różnych warunkach doświadczalnych. Her2-ujemne komórki MSU1.1 posłużyły do oceny nieswoistych oddziaływań. Za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej potwierdzono wysoką selektywność wiązania funkcjonalizowanych sfer. Swoistość wyselekcjonowanych peptydów (H2.1 i H2.2) była analizowana wcześniej [42, 252, 253]. Ponadto, jak wcześniej wykazały inne grupy, zarówno peptyd H2.1 [252], jak i peptyd H2.2 [42] ulegały internalizacji, co umożliwiło jedwabnym nośnikom sprzężonym z tymi peptydami funkcyjnymi internalizację po związaniu z receptorem, w Her2-dodatnich komórkach SKOV3 i SKBR3. W przypadku sfer kontrolnych i funkcjonalizowanych opartych na białku MS1 wykazano swoistość wiązania. Jednakże, dla analizowanych sfer MS2 oraz

sfer formowanych z mieszanek funkcjonalizowanych białek MS1 i MS2 (o lepszych właściwościach fizycznych) w tych samych warunkach eksperymentalnych obserwowano spadek selektywnych oddziaływań z komórkami Her2-pozytywnymi. Wykazano, że wraz ze wzrostem procentowej zawartości białek MS2 w mieszance następowały korzystne zmiany morfologii sfer, ale wzrost zawartości MS2 powodował jednocześnie spadek wiązania sfer do komórek. Jednakże, dla mieszanki 80/20% MS1/MS2 (kontrolne jak i funkcjonalizowane) wykazano znaczną poprawę stabilności sfer przy zachowanym poziomie wiązania do komórek dla sfer funkcjonalizowanych. Można zatem przyjąć, że wytwarzanie jedwabnych sfer można regulować w zależności od pożądanych zastosowań, poprzez kontrolowane mieszanie dwóch różnych białek jedwabiu pajęczego, o różnych właściwościach fizycznych i aktywności biologicznej.

W opisywanym projekcie doktorskim potwierdzono, że po zajściu zmian strukturalnych i wytworzeniu stabilnych sfer, domeny funkcyjne wiążące Her2 były eksponowane na powierzchni nośników, pozostały funkcjonalne oraz zachowały swoje właściwości swoistego kierowania do receptora. Co więcej, większość sfer prezentujących domeny funkcyjne na powierzchni (za wyjątkiem największych cząstek) ulegała także internalizacji do komórek wykazujących nadekspresję Her2. Morfologia komórek, które pobrały funkcjonalizowane jedwabne sfery różniła się od komórek nietraktowanych sferami – masywny wychwyty sfer powodował wyraźne zwiększenie wielkości komórek. Sygnał pochodzący z internalizowanych sfer zanikał w czasie, co może wskazywać, że jedwabne sfery były degradowane w komórkach, a tym samym morfologia komórek wracała do swojego początkowego stanu. Nie stwierdzono istotnego zahamowania wiązania czy internalizacji sfer dla funkcjonalizowanych sfer wytworzonych z mieszanki białek MS1/MS2 w stosunku 80/20%. Dlatego można domniemywać, że dodatek białka MS2 (przynajmniej w tym stosunku wagowym) nie miał wpływu na aktywność biologiczną cząstek. Wykazano również, że mechanizmem wnikania sfer do komórek jest endocytoza, gdyż komórki poddane inkubacji w temperaturze 4 °C nie pobierały sfer. Niska temperatura powodowała blokadę internalizacji receptora Her2, a tym samym hamowała internalizację funkcjonalizowanych jedwabnych cząsteczek po związaniu z receptorem. Znane są liczne przykłady internalizacji nanocząstek do komórek na drodze endocytozy. Cui C. i wsp. (2013) wykazali zaangażowanie ścieżki endocytozy w procesie internalizacji na przykładzie micelli o podobnych rozmiarach [223]. Verma A. i wsp. (2010) zaobserwowali, że w przypadku cząstek o stosunkowo dużych rozmiarach, ulegają one internalizacji do komórek zawsze na

drodze endocytozy [275]. Ponadto, w ostatnich latach pojawiły się doniesienia opisujące internalizację nanocząstek do komórek w wyniku endocytozy, różnicujące nanocząstki pod względem wielkości, kształtu, właściwości powierzchniowych oraz typu komórek. Harush-Frenkel i wsp. (2007) wykazali, że dodatnio naładowane nanocząstki wnikają do komórek głównie poprzez ścieżkę zależną od klatryny, natomiast ujemnie naładowane nanocząstki zostają internalizowane w ścieżkach innych niż te zależne od kaweoliny i klatryny [276, 277]. Dokładny mechanizm internalizacji funkcjonalizowanych jedwabnych wymaga dalszej charakterystyki.

W celu zbadania potencjału jedwabnych sfer jako systemu dostarczania leków wybrano powszechnie stosowany w terapii raka piersi środek chemioterapeutyczny z grupy antracyklin – dokсорubicynę (Dox). Inkorporacja dokсорubicyny do sfer z jedwabiu pajęczego MS1 nastąpiła w trakcie procesu formowania sfer, poprzez dodanie roztworu leku do roztworu białka i wymieszanie z roztworem fosforanu potasu. Jedwab miał wysoką zdolność wiązania dokсорubicyny w neutralnym pH, zapewniając wysoką wydajność ładowania ~350 ng Dox/ μ g sfer jedwabiu. Dox była inkorporowana do wszystkich wariantów jedwabnych sfer MS1 na podobnym poziomie. Według dostępnej wiedzy, silne powinowactwo może wynikać z adsorpcji hydrofobowej Dox do powtarzających się hydrofobowych łańcuchów jedwabiu. Inne grupy badaczy również wykazały wysoką wydajność ładowania badanego leku. Seib F. i wsp. (2013) uzyskali ponad 95% absorpcji leku przez jedwab, otrzymując końcową ilość 40 ng Dox/ μ g jedwabnych nanocząstek. Jednakże, cząstki te były oparte na jedwabiu pochodzącym z *B. mori* [270]. Dla cząstek wytworzonych z jedwabiu *B. mori*, wysoki poziom ładowania i charakterystyczny profil uwalniania Dox został częściowo wyjaśniony oddziaływaniami elektrostatycznymi [270]. Sfery z jedwabiu *B. mori* jako cząstki naładowane ujemnie w pH 7,4, mogły być atrakcyjnym celem wiązania dla dodatnio naładowanej Dox. W niniejszej pracy doktorskiej Dox ładowano do dodatnio naładowanych wariantów jedwabiu pajęczego. Zatem oba składniki (jedwab i Dox) miały taki sam ładunek. Jednakże, Hofer i wsp. skutecznie ładowali do dodatnio naładowanych sfer wykonanych z bioinżynierowanego jedwabiu eADF4(C16) dodatnio naładowane związki, takie jak FITC-lizozym i FITC-BSA [274]. Powyższe wyniki badań sugerują, że nie tylko siły elektrostatyczne są zaangażowane w interakcje lek – jedwab. Ponadto, opisane przez Seiba i wsp. (2013) jedwabne nanocząstki ładowane Dox uzyskiwano inną metodą, tj. były ładowane już po wytworzeniu nośników. W niniejszej pracy, prócz opisanej powyżej metody ładowania w trakcie produkcji sfer, oceniano również stopień inkorporacji Dox po uformowaniu sfer. W tym celu lek ładowano w

neutralnym pH (PBS, pH 7,4) do jedwabnych sfer wytworzonych z mieszanek dwóch różnych jedwabi MS1 i MS2, zatem sfer o lepszej morfologii i stabilności. Wykazano różnice w inkorporacji Dox w zależności od stosowanej metody. Uzyskano ponad 20% inkorporacji Dox, a w przeliczeniu ostateczna ilość inkorporowanego Dox do sfer wynosiła w przybliżeniu 500 ng Dox/ μ g sfer. Należy pamiętać, że rodzaj białka także wpływa na poziom inkorporacji leku. Z innych badań prowadzonych w naszym Zakładzie wynika, że w przypadku Dox, znacząco więcej leku ulegało inkorporacji do sfer MS1 w porównaniu ze sferami MS2 (praca w przygotowaniu). Zatem dodatek białka MS2 w mieszance mógłby zmniejszać potencjał ładowania Dox do sfer wytworzonych z mieszanek. Jednakże, jak opisano powyżej, pomimo właściwości białka MS2 uzyskano wyższy stopień inkorporacji Dox do sfer na bazie mieszanek, co może sugerować większą wydajność drugiej z opisywanych metod ładowania.

Wydajność ładowania i profil uwalniania Dox był zbliżony dla kontrolnych i funkcjonalizowanych wariantów jedwabiu, co wskazuje, że domeny funkcyjne nie wpływały na te procesy. Ponadto, obserwowany profil uwalniania Dox z jedwabnych struktur był podobny do otrzymanego we wcześniejszych badaniach [270]. Profil uwalniania Dox był zależny od pH w przypadku obu stosowanych metod ładowania. Niskie pH (4,5 lub 6) korelowało ze zwiększonym uwalnianiem leku z jedwabnych cząstek. Ta obserwacja jest zgodna z wieloma jedwabnymi systemami o różnym pochodzeniu (jedwabnik *B. mori*, bioinżynierowane białko ADF4) [241, 270, 274]. Opracowane profile uwalniania Dox ładowanego w trakcie procesu wytwarzania i po uformowaniu sfer wykazały, że więcej leku zostaje uwolnione ze sfer inkorporowanych Dox w trakcie procesu wytwarzania sfer. Obserwowano blisko 90% uwolnionego leku ze sfer MS1 w ciągu 14 dni eksperymentu, podczas gdy dla sfer ładowanych po ich uformowaniu, uwolniło się zaledwie 40% leku. Jednakże, uzyskaną różnicę w uwalnianiu można częściowo wyjaśnić zastosowaną metodą, ale także wpływem domieszkowania białkiem MS2 o ujemnym ładunku.

Po podaniu sfer ładowanych Dox do komórek i inkubacji, obserwowano gromadzenie molekuł Dox w jądrze komórkowym. Biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje z mikroskopu konfokalnego, wykazujących lokalizację jedwabnych sfer w cytoplazmie i brak ich wnikania do jądra, można wnioskować, że Dox akumulowana w jądrze musiała zostać uwolniona ze sfer przed wejściem do jądra. Drobnocząsteczkowa Dox może penetrować obszar jądrowy, lokalizować się w jądrze i ostatecznie wywierać działanie cytotoksyczne poprzez swój główny mechanizm działania uszkodzeń podwójnej nici DNA [278]. Jednakże, w przypadku, gdyby Dox była uwięziona w jedwabnych sferach, miałyby utrudniony dostęp

do swojego celu, a tym samym efekt cytotoksyczny wywierany na komórki byłby zminimalizowany. Z drugiej strony, wykazano wzmocnione przyłączanie i selektywną internalizację funkcjonalizowanych cząstek do Her2-dodatnich komórek nowotworowych. Zwiększenie wychwytu komórkowego może więc rekompensować zmniejszenie wpływu toksycznego inkorporowanej Dox (związanej z kapsułkowaniem leku), a to z kolei indukuje wyższą swoistą toksyczność Dox dostarczanej przy pomocy tego systemu. Liczne doniesienia badań *in vitro* potwierdzają zaobserwowany mechanizm działania Dox i jej akumulację w jądrze po uwolnieniu z nanoonośników, jednakże wadą większości systemów jest brak swoistości i/lub brak eliminacji nośnika po uwolnieniu leku.

Badania profilu uwalniania leku wykazały, że przy wartości pH 4,5, tempo uwalniania Dox z jedwabnych sfer znacznie wzrasta. To spostrzeżenie jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [270]. Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że pobór jedwabnych cząstek przez komórki następujący w wyniku endocytozy, prowadzący do gromadzenia się sfer w endosomach (pH 6,0), a następnie w lizosomach (pH 4,5) będzie indukował zwiększone uwalnianie substancji czynnej. Kwaśne lizosomalne mikrośrodowisko nie tylko może zwiększać tempo uwalniania Dox, ale także enzymy proteolityczne obecne w lizosomach mogą przyczyniać się do wzmożonej degradacji sfer, co mogłyby dodatkowo zwiększyć uwalnianie leku. Inna grupa wykazała, że hamowanie mechanizmu endocytozy i funkcji lizosomalnych zmniejsza aktywność leku przenoszonego przez peptyd LTVSPWY (H2.2) [42]. Jednak, jak wspomniano wcześniej, proces wychwytu sfer i losy jedwabnych nośników wewnątrz komórek wymagają dalszych badań. Degradacja sfer wewnątrz komórek jest kluczowym czynnikiem w rozwoju strategii ukierunkowanego dostarczania leków. Strategia ta może zapobiegać akumulacji w organizmie cząstek nośników leków i prowadzić do wyeliminowania potencjalnej toksyczności. Biorąc pod uwagę fakt, że większość badanych nośników nie ulega enzymatycznej degradacji, system oparty na bioinżynierowanym jedwabiu budzi ogromne nadzieje.

Oceniano również cytotoksyczność jedwabnych sfer nie ładowanych lekiem. Wykazano, że jedwabne sfery nie były cytotoksyczne, co jest zgodne z licznymi badaniami [200, 219, 279]. Jednakże, sfery ładowane Dox skutecznie zabijały komórki, a co najważniejsze, funkcjonalizowane sfery powodowały istotnie wyższą cytotoksyczność w porównaniu ze sferami kontrolnymi. Przeprowadzona w rozprawie doktorskiej ocena działania cytotoksycznego w teście MTT Dox dostarczanej w jedwabnych sferach na komórki linii raka jajnika SKOV3, raka piersi SKBR3 oraz kontrolne fibroblasty MSU1.1 umożliwiła

określenie liczby martwych komórek pod wpływem badanego leku. Istnieje wiele prac opisujących cytotoksyczność Dox dostarczanej przy pomocy nanocząsteczkowych systemów badanych przy pomocy testu MTT [280-283]. Wyniki tej części badań wykazały zdolność funkcjonalizowanych jedwabnych sfer ładowanych Dox do indukcji cytotoksyczności zarówno w linii komórkowej SKBR3, jak i SKOV3. Cytotoksyczne działanie jedwabnych cząstek ładowanych lekiem można wiązać ze zdolnością Dox do wbudowywania się pomiędzy podwójną nić DNA i hamowanie działania topoizomerazy II [278]. Dox hamuje także syntezę kwasów nukleinowych na drodze alkilacji, chelatowania jonów żelaza, cynku i miedzi, wiązania się z lipidami błony komórkowej i zmianą jej przepuszczalności oraz tworzenia wolnych rodników [278, 284]. W pracy doktorskiej wykazano, że funkcjonalizowane jedwabne sfery MS1 ładowane lekiem istotnie statystycznie zmniejszały żywotność komórek nowotworowych z nadekspresją Her2 w porównaniu ze sferami kontrolnymi MS1 bez domeny adresującej, ale z inkorporowanym Dox. Obserwowana cytotoksyczność była zależna od zastosowanej ilości jedwabnych sfer, a tym samym dawki Dox. Ponadto, nie wykazano różnic w cytotoksyczności indukowanej przez funkcjonalizowane sfery wypełnione lekiem w porównaniu z kontrolnymi sferami w stosunku do komórek Her2-ujemnych. Jednakże, w przypadku sfer MS1 najwyższe stężenie sfer ładowanych Dox powodowało cytotoksyczność. Jak opisano wcześniej, sfery oparte na białkach MS1 były ładowane Dox w trakcie procesu ich wytwarzania. Wykazano, że z tak przygotowanych cząsteczek uwalnia się blisko 60% leku już w pierwszych godzinach inkubacji. Ta obserwacja może tłumaczyć cytotoksyczność w linii kontrolnej – sfery nie wiązały się do komórek, jednak uwolniły Dox do pożywki hodowlanej, a to z kolei mogło negatywnie oddziaływać na komórki. Mimo to, w przypadku wszystkich testowanych wariantów sfer MS1 w stężeniu 1,88 µg/ml żywotność komórek wynosiła około 90%. Jednakowe stężenie funkcjonalizowanych wariantów jedwabnych sfer powodowało zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych nawet do 40 %. Zaobserwowano także, że sfery ładowane lekiem drugą metodą, tj. po wytworzeniu cząstek, indukowały znacznie mniejszą nieswoistą toksyczność w stosunku do komórek. Wykazano, że cytotoksyczność funkcjonalizowanych sfer (H2.1MS1/H2.1MS2-Dox i H2.2MS1/H2.2MS2-Dox) w stosunku do Her2-dodatnich komórek nowotworowych była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu ze sferami kontrolnymi (MS1/MS2-Dox). Podczas gdy funkcjonalizowane sfery wykazywały zmniejszenie żywotności komórek w zależności od dawki, nawet największe zastosowane stężenie sfer kontrolnych bez domen adresujących (25 µg/mg) nie indukowało cytotoksyczności w liniach komórek nowotworowych. Prawdopodobnie, różnica w

aktywności biologicznej polegała na innej kinetyce uwalniania leku uwięzionego w nośnikach ładowanych drugą metodą – w pH 4,5 sfery na bazie mieszanek uwalniały około 25% Dox w ciągu 24 godzin i tylko ~40% skumulowanego uwalniania Dox obserwowano w ciągu 14 dni. Natomiast w pH 7,4 wykazano jedynie 20% uwalniania leku ze sfer w ciągu 14 dni. Uzyskane wartości współczynnika IC_{50} dla Dox dostarczanej w sferach potwierdziły swoistość funkcjonalizowanych jedwabnych nośników. Dla linii kontrolnej MSU1.1 wartość IC_{50} dla wszystkich wariantów sfer była kilkunastokrotnie wyższa w porównaniu z liniami Her2-dodatnimi, co potwierdza istotnie mniejsze nieswoiste oddziaływania. Yabbarov i wsp. (2013) porównywali aktywność cytotoksyczną nanocząstek polimerowych sprzężonych z Dox oraz niskocząsteczkowej Dox w linii komórek SKOV3 i kontrolnych limfocytów krwi obwodowej. Wykazano 2-krotnie wyższy współczynnik IC_{50} dla koniugatów nanocząstek z Dox w porównaniu z wolną Dox w linii SKOV3, a w linii kontrolnej różnica była 10-krotna [283]. Miao J. i wsp (2013) wykazali możliwość pokonania lekooporności gdy lek był dostarczany w nanocząstkach. Zaobserwowali bowiem 6-krotnie oraz 2-krotnie mniejszy IC_{50} w przypadku stosowania ładowanych Dox nanocząstek lipidowych odpowiednio w linii komórek raka piersi MCF7/ADR i jajnika SKOV3/TR30 opornych na Dox w porównaniu z wolnym lekiem [281].

Mimo trwania licznych badań nad biologią i leczeniem raka piersi oraz pojawiania się nowoczesnych leków celowanych, antracykliny (do których należy Dox) wciąż mają silną pozycję w terapii tego nowotworu, czego efektem jest fakt, że nadal większość chorych na raka piersi na jednym z etapów choroby otrzymuje chemioterapię, w skład której wchodzi Dox [285]. Najbardziej istotnym działaniem niepożądanym ograniczającym stosowanie Dox jest kardiotoksyczność [286]. Ryzyko wystąpienia kardiotoksyczności zwiększa się gwałtownie po przekroczeniu kumulacyjnych dawek Dox, za które dotąd przyjmowano 550 mg/m^2 [286]. Obecnie, w dobie indywidualizacji leczenia, maksymalna dawka dokсорubicyny powinna być oceniana dla każdego pacjenta indywidualnie, po uwzględnieniu występujących u niego czynników ryzyka uszkodzenia mięśnia sercowego. Kluczową rolę w mechanizmie uszkodzenia serca przez Dox odgrywa stres oksydacyjny oraz zaburzenia funkcji i struktury mitochondriów [287].

W ostatnich latach w celu poprawy indeksu terapeutycznego Dox wprowadzono do praktyki klinicznej liposomalną postać tego leku [288-290]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego Dox liposomalnej jest podobny do mechanizmu konwencjonalnej formy leku. Jednak umieszczenie cząsteczek substancji czynnej w liposomach wiąże się z

inną dystrybucją leku, niż to ma miejsce w przypadku klasycznej postaci Dox. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach udowodniono, że liposomalna postać Dox wykazuje zmniejszoną dystrybucję do komórek mięśnia sercowego, błony śluzowej żołądka oraz jelit, zachowując jednocześnie jednakową skuteczność cytotoksyczną w guzie [291, 292]. Wynika to z faktu, że podane dożylnie liposomy, w przeciwieństwie do drobnocząsteczkowej Dox, nie są w stanie opuścić krążenia poprzez prawidłowe kapilary serca, natomiast bez problemu wydostają się one do otaczających komórek przez nieprawidłowo zbudowane oraz przeciekające naczynia w obrębie guza nowotworowego. Profil farmakokinetyczny leku wskazuje, że klirens Dox z krwi jest zależny od nośnika – Dox staje się dostępna dopiero po przejściu liposomów z krążenia do kompartmentu tkankowego [289, 293]. Oprócz liposomów, w licznych modelach zwierzęcych testowano także inne nanocząsteczkowe systemy nośników leków ładowane Dox [46].

Szczególną grupę chorych stanowią pacjentki z nadekspresją receptora Her2, u których planuje się terapię celowaną trastuzumabem, uważanym za potencjalnie kardiotoksyczny [294]. Dox jest aktywna w grupie chorych z nadekspresją Her2, jednak jej skojarzenie z terapią celowaną trastuzumabem okazało się zbyt toksyczne i dlatego nie jest akceptowalne dla pacjentów [295]. Przeprowadzono badania kliniczne I i II fazy skojarzenia niepegyłowanej liposomalnej Dox z trastuzumabem i wykazano, że takie połączenie jest skuteczne oraz bezpieczne kardiologicznie [296]. Batist G. i wsp. wykazali, że w przypadku podania liposomalnej niepegyłowanej formy leku w ciągu 24 godzin od infuzji jest uwalniane zaledwie 10% zawartej w otoczce liposomalnej Dox [297]. Jednakże, pegyłowana postać leku uwalnia ponad połowę zawartej w niej Dox w ciągu godziny od podania i ponad 90% w ciągu 24 godzin od wstrzyknięcia, co ma istotny wpływ na profil toksyczności leku i stosunkowo częste występowanie poważnych działań niepożądanych [289, 293]. Wśród działań niepożądanych występujących po podaniu pegyłowanej doksorubicyny liposomalnej można wymienić: biegunkę, neutropenię, trombocytopenię, niedokrwistość, osłabienie, nudności, wymioty, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, łysienie oraz rumień skórny [293]. Toksyczność hematologiczna była częstym działaniem niepożądanym niepegyłowanej liposomalnej doksorubicyny ograniczającym dawkę w badaniach klinicznych I i II fazy. Obserwowano objawy niedokrwistości, neutropenii oraz małopłytkowość [298].

Dlatego niezbędne jest poszukiwanie takich nośników, które umożliwiają maksymalne zwiększenie aktywności Dox w obrębie tkanki nowotworowej oraz ograniczenie występowania działań niepożądanych, w tym zmniejszenie ryzyka kardiotoksyczności w

przebiegu leczenia. Trwają prace nad modyfikacją cząsteczek liposomów, co zostało udowodnione zarówno w badaniach przedklinicznych na zwierzętach, jak również później w badaniach klinicznych [289, 291, 297]. Jednak projektowane nanosystemy bazujące na biernym dostarczaniu leków wydają się być niewystarczające. Znanych jest wiele przykładów dotyczących badań *in vivo* funkcjonalizowanych nanośników, które wykazują większą selektywność oddziaływań i powinowactwo do mikrośrodowiska guza. Jednak ich krytycznym ograniczeniem jest brak degradacji i systemowej eliminacji z organizmu po uwolnieniu transportowanego leku. Dlatego w niniejszym projekcie doktorskim skupiono się na ocenie *in vivo* wiązania i biodystrybucji sfer opartych na funkcjonalizowanym jedwabiu pajęczym, znanym ze swojej biokompatybilności i biodegradowalności. Podjęto także próbę oceny efektu terapeutycznego Dox dostarczonej za pomocą jedwabnych sfer. Badania wstępne wykazały zwiększoną swoistą akumulację funkcjonalizowanych sfer jedwabiu pajęczego w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie. Jednocześnie wykazano efekt terapeutyczny Dox dostarczanej w jedwabnych nośnikach w stosowanym modelu *in vivo*.

Seib i wsp. (2013) również wykorzystali model myszy w celu zbadania działania przeciwnowotworowego innej formy morfologicznej jedwabiu do dostarczania Dox – hydrożelu. Wykazano zmniejszenie rozmiarów guza i mniejsze ryzyko przerzutów w grupie zwierząt, którym podawano domiejscowo (w miejsce guza) jedwabny hydrożel ładowany Dox, w stężeniu Dox 8 mg/kg m.c. (160 µg/mysz). Istotnie statystycznie różnice były obserwowane w szóstym tygodniu leczenia [250]. Seib i wsp. (2013) podawali myszom jedwabny hydrożel ładowany Dox w 12 dniu eksperymentu. W niniejszej pracy stosowano niższą dawkę leku (5 mg Dox/kg m.c.), a także prowadzono krótszą obserwację. W pracy doktorskiej obserwacja trwała 20 dni. Ponadto, w eksperymencie prowadzonym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej terapię Dox rozpoczęto po 14 dniach od podania komórek (1 mln komórek/mysz), kiedy rozmiar guza wynosił średnio 100 mm³. W badaniach MacKay i wsp. (2009) nanocząstki polipeptydowe zawierające Dox w dawce 5 mg/kg m.c. podano jednorazowo myszom już po 8 dniach od momentu wszczepienia komórek (250-500 tysięcy komórek/mysz), kiedy objętość guza była znacznie mniejsza niż 100 mm³ [299]. Po zastosowaniu tego schematu leczenia, MacKay i wsp. (2009) obserwowali istotne zahamowanie wzrostu guzów w porównaniu z grupą kontrolną.

W niniejszej pracy wykazano, że Dox dostarczany w sferach powodował zmniejszenie (lub brak) intensywności luminescencji guzów Her2-dodatnich – D2F2/F2 w porównaniu z guzami bez ekspresji Her2 – D2F2. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że w wyniku

zwiększonej akumulacji funkcjonalizowanych nośników w miejscu guza Her2-dodatniego obserwowano wzmożoną apoptozę oraz martwicę komórek nowotworowych, a w efekcie gwałtowny spadek luminescencji. Co więcej, w grupach kontrolnych otrzymujących niskocząsteczkową Dox obserwowano wzrost intensywności luminescencji w miarę wzrostu guzów niezależnie od obecności Her2 na powierzchni komórek. Zatem można wnioskować, że konwencjonalna doksorubicyna wywoływała mniejszy efekt toksyczny na komórki nowotworowe w porównaniu z Dox dostarczaną w sferach. Zwiększony efekt toksyczny nanosystemów dostarczających Dox potwierdzili inni badacze. Wykazano zwiększone proapoptotyczne i pronekrotyczne działanie Dox dostarczanej w różnych systemach nanocząsteczkowych [254, 300, 301]. W pracy doktorskiej zaobserwowano, że w guzach Her2-dodatnich, pomimo zaniku ich luminescencji, następowało powiększenie objętości guzów. Ten efekt był widoczny w końcowych dniach obserwacji (tj. dzień 18 i 20). Prawdopodobną przyczyną może być selekcja komórek nowotworowych opornych na Dox, które jednak nie wykazują aktywności lucyferazy. W 16 dniu eksperymentu obserwowano sygnał fluorescencyjny pochodzący ze sfer utrzymujący się w miejscu guza, jednak wykazano zmniejszenie jego intensywności.

Niezwykle istotny jest wykazany w przedstawionej pracy brak ogólnoustrojowej toksyczności po zastosowaniu celowanego leczenia. Wykonana w rozprawie doktorskiej analiza histopatologiczna wykazała brak kardiotoxyczności Dox dostarczanej w sferach. Kaminskas L i wsp. (2012) opisują wyraźne uszkodzenia tkanki mięśnia sercowego w przypadku podawania wolnej Dox. Opisano utratę poprzecznego prążkowania, naciekanie komórek immunologicznych oraz wakuolizację kardiomiocytów w modelu zwierzęcym [302, 303]. Natomiast Pramanik D. i wsp. (2012) wśród objawów indukowanej Dox kardiotoxyczności wymieniają obecność komórek apoptotycznych, komórek przerostowych oraz ostrą kardiomiopatię [304]. Podobnie Zhen Z. i wsp. (2013) wykazali patologiczną indukcję apoptozy w komórkach mięśnia sercowego [301]. Wyniki naszych badań nie wykazały widocznych makroskopowo ostrych zmian w sercach myszy traktowanych niskocząsteczkową Dox, co może wynikać z krótkiego czasu obserwacji myszy. Inni badacze obserwowali poważne efekty uboczne objawiające się głównie kardiotoxycznością w 4 tygodniu eksperymentu [302].

Ponadto, niezależnie od podawanego leczenia, nie obserwowano zmian makroskopowych w innych badanych narządach, a mianowicie w nerkach i płucach. Natomiast w wątrobie obserwowano atypowe zmiany makroskopowe, stanowiące

prawdopodobnie skupiska limfocytarne. Skupiska były widoczne w przypadku wszystkich analizowanych czynników, jednakże występowały w większej ilości w grupach otrzymujących dożylnie sfery, w porównaniu z grupami traktowanymi dożylnie Dox i PBS czy sfery doguzowo. Pojawienie się komórek układu immunologicznego wydaje się logiczne, jako że obserwujemy wyraźną akumulację jedwabnych sfer w wątrobie. Gromadzenie się jedwabnych nośników w wątrobie było spowodowane ich stosunkowo dużym rozmiarem. Wiadomo, że wielkość nośników leków odgrywa kluczową rolę w ich profilu farmakokinetycznym. Cząstki większe niż 300 nm zostają wchłonięte przez organy układu fagocytarnego, jak wątroba [272]. W celu eliminacji tego zjawiska konieczne jest zastosowanie cząstek o mniejszych rozmiarach.

Podsumowując, podejście ukierunkowanego dostarczania wykracza poza standardową terapię, ponieważ reprezentuje najważniejsze zalety miejscowego stosowania leków, a mianowicie wysokie stężenie lokalne i niską ekspozycję ogólnoustrojową. W niniejszej pracy opracowano nowatorski system oparty na funkcjonalizowanym jedwabiu. Kierowanie jedwabnych nanosfer za pośrednictwem peptydów oferowało wiele korzyści w stosunku do stosowanych rutynowo konwencjonalnych leków niskocząsteczkowych. Nanosfery sprzężone z peptydem skutecznie dostarczały substancję aktywną bezpośrednio do przestrzeni wewnątrzkomórkowej docelowych Her2-pozytywnych komórek nowotworowych, umożliwiając jednocześnie kontrolowane uwalnianie leku. Zatem, ukierunkowane dostarczanie cząsteczek leku może potencjalnie zwiększyć indeks terapeutyczny chemioterapeutyków w stosunku do komórek nowotworowych, jednocześnie zmniejszając toksyczność w normalnych tkankach. Co więcej, koncepcja celowanego dostarczania leku nie jest ograniczona do leczenia raka, ale ma znacznie szersze zastosowanie. Opisane wyniki badań wskazują na nowe możliwości zastosowania funkcjonalizowanych jedwabnych cząstek również do celów diagnostycznych. Odpowiednie domeny funkcyjne (np. ligandy) pozwalałyby na wczesne wykrycie i zdiagnozowanie nowotworu. Istotną cechą jedwabnych sfer, jest również możliwość ich znakowania fluorescencyjnego lub przy pomocy izotopu, co pozwalałoby na poprawę jakości obrazowania w przebiegu terapii. Te właściwości czynią jedwabne sfery potencjalnie cząsteczkami teranostycznymi, które posiadają zarówno właściwości diagnostyczne jak i terapeutyczne. Właściwości te pozwalałyby śledzić ich „drogę” w organizmie ludzkim, a to z kolei umożliwiłoby weryfikację skuteczności terapii oraz diagnostyczną ocenę rozległości procesu nowotworowego.

6. Wnioski

- 1) Zastosowanie bakteryjnego systemu ekspresji wraz z protokołem oczyszczania opartym na właściwościach naturalnego jedwabiu umożliwia uzyskanie funkcjonalnych bioinżynierowanych jedwabi.
- 2) Peptydy funkcyjne wiążące receptor Her2 (H2.1 oraz H2.2) można przyłączać do sekwencji jedwabiu za pomocą łącznika o długości 2 aminokwasów, przy czym wydajność wiązania jedwabiu funkcjonalizowanego na N-końcu jest wyższa w porównaniu z C-końcową funkcjonalizacją białka.
- 3) Domeny funkcyjne nie wpływają na właściwości samoorganizacji białek jedwabiu, a sfery wytworzone w oparciu o białka z przyłączonymi domenami pozostają funkcjonalne.
- 4) Jako że sfery oparte na bioinżynierowanych białkach MS1 i MS2 charakteryzują się innymi właściwościami fizycznymi, poprzez mieszanie tych białek w różnych stosunkach wagowych, można kontrolować właściwości fizyczne uzyskiwanych jedwabnych nośników.
- 5) Funkcjonalizowane jedwabne sfery wiążą się swoiście i ulegają internalizacji do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2, co umożliwia ich wykorzystanie w terapii celowanej i diagnostyce guzów o Her2-dodatnim fenotypie.
- 6) Ze względu na zdolność inkorporacji z wysoką wydajnością, a następnie zależnego od pH uwalniania doksorubicyny, jedwabne sfery mogą posłużyć jako system dostarczania i uwalniania leku swoiście, dopiero po wnikięciu do komórek nowotworowych.
- 7) Funkcjonalizowane jedwabne sfery ładowane lekiem skutecznie zabijają docelowe komórki nowotworowe.

7. Streszczenie

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 było stworzenie i rozwijanie platformy dla dostarczania substancji czynnych selektywnie do komórek nowotworowych. Koncepcję systemu udowodniono wykorzystując model raka piersi charakteryzujący się nadekspresją receptora Her2. Cząsteczkami transportującymi są sfery oparte na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym. 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.

W pierwszym etapie projektu doktorskiego skonstruowano wektory ekspresyjne kodujące sztuczne geny jedwabiu pajęczego z przyłączonymi domenami funkcyjnymi (domenami rozpoznającymi receptor Her2). Bioinżynierowane białka jedwabiu wyprodukowano w dużej skali laboratoryjnej w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i skutecznie oczyszczono metodą termicznej denaturacji. Uzyskane białka analizowano w teście wiązania do receptora *in vitro* na ludzkich komórkach ustalonych linii nowotworowych wykazujących nadekspresję Her2 – SKOV3 i SKBR3, oraz kontrolnych Her2-negatywnych ludzkich fibroblastach MSU1.1. W celu oceny swoistości wiązania funkcjonalizowanych białek jedwabiu pajęczego do komórek, białka zostały kowalencyjnie przyłączone do fluorescencyjnych kulek. Eksperymenty wiązania białek MS1 w formie rozpuszczalnej wykazały, że utworzenie białek fuzyjnych nie zakłóciło aktywności domen H2.1 i H2.2. Wykazano swoiste wiązanie białek fuzyjnych z dołączoną domeną rozpoznającą receptor Her2 do Her2-dodatnich komórek w porównaniu z komórkami Her2-ujemnymi. Jednocześnie, wiązanie jedwabiu kontrolnego MS1 bez domeny funkcyjnej było znikome dla wszystkich testowanych linii komórkowych. 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. Zaobserwowano, że przyłączenie peptydu przez zastosowanie łącznika o długości dwóch aminokwasów jest wystarczające dla N-końcowej funkcjonalizacji jedwabiu i zachowania pełnej możliwości wiązania peptydu fuzyjnego.

W kolejnym etapie badań opracowano technologię wytwarzania nośników opartych na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczego. Funkcjonalizowane białka MS1 formowały sfery w trakcie wysalania jonami fosforanowymi. Sfery charakteryzowano pod względem morfologii oraz wiązania do komórek. Uzyskane sfery miały kulisty kształt i przybliżone średnie rozmiary 400 nm, jednak obserwowano szeroki rozkład wielkości cząstek. Wykazano, że domeny funkcyjne H2.1 i H2.2 nie wpływały na zdolność białek jedwabiu do tworzenia sfer. Za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej potwierdzono wysoką selektywność wiązania sfer wytworzonych z funkcjonalizowanego pajęczego jedwabiu MS1 w porównaniu z komórkami Her2-ujemnymi, oraz w odniesieniu do sfer wytworzonych z jedwabiu kontrolnego bez domeny funkcyjnej. Obserwowane swoiste interakcje sfer z receptorem, a następnie ich wewnątrzkomórkowa internalizacja potwierdziły, że domeny funkcyjne były aktywne. Następnie, do jedwabnych sfer ładowano z wysoką wydajnością lek modelowy doksorubicynę (Dox). Profil uwalniania Dox był zależny od pH, a niskie pH korelowało ze zwiększonym uwalnianiem leku z jedwabnych cząstek. Funkcjonalizowane jedwabne sfery MS1 załadowane Dox powodowały istotny statystycznie spadek żywotności komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z komórkami bez receptora i do kontrolnych sfer MS1 bez domeny adresującej. Obserwowana cytotoksyczność nie była powodowana jedwabiem pajęczym.

W dalszym etapie projektu wprowadzono drugi typ bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego tj. białko MS2. Uzyskano nowe wektory ekspresyjne, po czym białka typu MS2 wyprodukowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i oczyszczono metodą termicznej denaturacji. Następnie wytworzono sfery z białek kontrolnych i funkcjonalizowanych typu MS2. Sfery scharakteryzowano pod względem właściwości fizycznych i skuteczności wiązania do komórek nowotworowych. Sfery oparte na białkach MS1 i MS2 różniły się pod względem morfologii, stabilności, potencjału dzeta oraz wiązania do komórek. Sfery typu MS2 były bardziej stabilne niż sfery typu MS1, jednakże dla analizowanych funkcjonalizowanych sfer MS2 w tych samych warunkach eksperymentalnych obserwowano spadek selektywnych oddziaływań z komórkami Her2-pozytywnymi w porównaniu do wiązania sfer typu MS1. Dlatego, w celu uzyskania nośników o optymalnych właściwościach,

wytwarzano jedwabne sfery poprzez kontrolowane mieszanie dwóch różnych białek jedwabiu pajęczego MS1 i MS2, o różnych właściwościach fizycznych i aktywności biologicznej. 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 jak dla białek typu MS1, przy jednocześnie znacznym zwiększeniu stabilności sfer i poprawieniu morfologii.

Sfery wytworzone z mieszanek MS1/MS2 użyto do inkorporacji doksorubicyny. Opracowano profil ładowania i uwalniania leku. Ponownie 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 doksorubicyną powodowały spadek żywotności komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z komórkami Her2-negatywnymi oraz kontrolnymi sferami bez domen funkcyjnych. Mechanizmem wnikania sfer do komórek była endocytoza, gdyż niska temperatura powodowała blokadę internalizacji receptora Her2, a tym samym hamowała internalizację funkcjonalizowanych jedwabnych cząsteczek po związaniu z receptorem. Ponadto, badania profilu uwalniania leku wykazały, że tempo uwalniania Dox z jedwabnych sfer znacznie wzrastało w niskim pH. Tym samym pobór jedwabnych cząsteczek przez komórki w wyniku endocytozy, prowadzący do gromadzenia się sfer w endosomach, a następnie w lizosomach, indukował kontrolowane uwalnianie substancji czynnej.

Końcowa faza projektu doktorskiego dotyczyła badań wstępnych *in vivo* wiązania i biodystrybucji jedwabnych sfer, a także oceny efektu terapeutycznego Dox dostarczanej za pomocą jedwabnych sfer. Wykazano zwiększoną akumulację funkcjonalizowanych sfer jedwabiu pajęczego w miejscu guza o Her2-dodatnim fenotypie. Po podaniu dożylnym sfery gromadziły się również w płucach i wątrobie. Ponadto wykazano, że Dox dostarczana w sferach zapewniała swoisty efekt terapeutyczny w stosowanym modelu *in vivo*. Analiza histopatologiczna wykazała brak ogólnoustrojowej toksyczności leku dostarczanego w sferach.

Badania zawarte w rozprawie doktorskiej potwierdziły ogromny potencjał jedwabnych sfer w dostarczaniu środka terapeutycznego do specyficznego mikrośrodowiska guza. Ponadto, jedwabne nośniki mogą łączyć funkcje terapeutyczne i diagnostyczne. Obrazowanie umożliwi monitorowanie ich działania w organizmie ludzkim.

8. Abstract

Anticancer agents at the therapeutic doses administered systemically may cause serious adverse events. The therapeutic benefit-toxicity balance is often not acceptable for patients. Thus, there is an intensive research carried out to deliver the toxic agents directly to the tumor cells sparing the other cells of the body. Various approaches were tested in model systems and in clinical trials. However, all systems had significant limitations which include instability of the active substance in circulation, lack of vehicle biodegradation or local and systemic elimination. The aim of the dissertation was the construction of delivery vehicles for active substances which target cancer cells specifically. The proof-of-concept was developed in Her2-overexpressing breast cancer model. The vehicles are spheres constructed using bioengineered spider silk functionalized with specific peptides targeting given cell. A silk biomaterial is known for its mechanical strength, biocompatibility and biodegradability. A silk multimer sequence constitutes the core with controlled molecular weight and the secondary structure, thus enables the control of sizes, enzyme resistance, biomaterial degradation rates and drug release rates. A silk biomaterial is functionalized with peptides recognizing target cells.

The first step of the study was the construction of expression vectors encoding artificial spider silk genes with attached functional domains (domains recognizing Her2). Then bioengineered silk proteins were produced on a laboratory scale using a bacterial expression system and successfully purified by heat denaturation. The proteins were analyzed in the receptor-binding assay. To determine the cell binding potential of functionalized spider silk, the proteins were covalently coupled to fluorescent beads. SKOV3 and SKBR3 cells that were overexpressing the Her2 and MSU1.1 control cells (Her2-negative fibroblasts) were incubated in the presence of bead-silk conjugate variants. The functionalized spider silk conjugates demonstrated substantially higher binding to Her2-positive than to Her2-negative cells. The binding of control protein MS1 to all tested cell lines was negligible. Furthermore, the binding capacity of the particular silk proteins to Her2-positive cells was compared. The functionalization of the N-terminus of the silk sequence demonstrated a considerably higher binding capacity than functionalization at the C-terminus. The experiment for binding soluble proteins indicated that the fusion peptide at the N-terminus of silk by using a 2AA linker did

not abolish the activity of H2.1 and H2.2 domains. The proteins with N-terminal functionalization were selected for further studies.

The control and functionalized spider silk proteins were subsequently examined for their sphere formation ability. The control and functionalized MS1 protein formed spheres in a simple aqueous process triggered by phosphate ions. The functional domains H2.1 and H2.2 did not affect the silk's potential to form spheres. The spheres were characterized in terms of morphology and biological activity. The MS1 type proteins formed spherical particles with sizes of approximately 400 nm and a wide size distribution. The H2.1 and H2.2 domains did not affect the silk property to form spheres. Spheres made of the functionalized MS1 spider silk showed the statistically significant increase in binding to cells overexpressing Her2 comparing to Her2-negative cells and control MS1 spheres without targeting domains. Then, silk spheres were loaded with a model drug doxorubicin (Dox), providing a high loading efficiency. The Dox release profile was pH-dependent, and low pH caused the increase in drug release rate. The functionalized MS1 spheres loaded with Dox induced a statistically significant reduction of Her2-overexpressing cells viability as compared to cells without the Her2 receptor, as well as control MS1 spheres. The observed cytotoxicity was not caused by spider silk.

In the further stage of the project, a second type of bioengineered spider silk, the MS2 protein, was introduced. New expression vectors were obtained, and then the control and functionalized MS2 proteins were produced on a laboratory scale using bacterial expression system and successfully purified by heat denaturation. Subsequently, the spheres made of MS2 silk proteins variants were prepared. The spheres were characterized in terms of physical properties, as well as binding efficiency to cancer cells. The MS1- and MS2-based spheres differed in terms of morphology, stability, zeta potential and cell binding efficiency. Particles based on the functionalized MS2 proteins were more stable comparing with the MS1 type particles, however demonstrated decreased selective binding to targeted Her2-positive cells as compared to the functionalized MS1 spheres. Thus, in order to obtain the optimal characteristics of carriers, the silk spheres were prepared by mixing MS1 and MS2 types of proteins, which differed in terms of physical properties and biological activity. It was shown, that a blending process might be used as a controlling factor of particle properties. The increasing amount of the MS2 protein in blends resulted in the improvement of physical properties of particles, yet lowered their cell binding efficiency. However, for 80/20% blends

(the functionalized MS1/MS2), the binding efficiency was maintained with greatly improved sphere stability.

Particles at a weight ratio of 80/20% were used for Dox incorporation. Kinetic profiles of drug loading and release were developed. It was shown, that silk spheres were able to slowly release the medicine, and a factor accelerating the release process is low pH. Furthermore, the potential for the delivery of a therapeutic agent confined in silk spheres to cancer cells and killing the cells *in vitro* was analyzed. The functionalized silk spheres loaded with Dox significantly higher reduced the cell viability of Her2-overexpressing cells comparing with Her2-negative cells and comparing to control spheres without the targeting domains. The binding domains were specifically internalized into cells upon binding with Her2 receptor. Moreover, the release of Dox from the spheres inside the cells and its accumulation in the nuclei was observed. These observations suggested that the cell uptake of silk spheres followed endocytosis pathway, which resulted with the accumulation of spheres in endosomes and then in lysosomes.

The final phase of thesis involved preliminary *in vivo* studies of silk spheres binding and bio distribution, as well as the evaluation of the therapeutic effect of Dox delivered in silk spheres. The increased accumulation of functionalized spider silk spheres at the site of the Her2-positive tumor was demonstrated. Spheres accumulated also in lungs and liver after intravenous injection. Furthermore, it was shown that Dox delivered in functionalized silk spheres provided the specific therapeutic effect *in vivo*. A histopathological analysis revealed no systemic toxicity of drug delivered in silk spheres.

The obtained results confirmed the great potential of spider silk-based carriers for the delivery of a therapeutic agent to the specific tumor microenvironment. Besides, silk carriers may join both therapeutic and diagnostic properties. Using the available imaging methods, it is possible to track their activity in human body.

9. Literatura

- [1] Boyle P, Lewin B. World Cancer Report 2008. World Health Organization 2008.
- [2] Murawa D, Dyzmann-Sroka A, Kycler W, Lamch K, Kubiak AJ, Jędrzejczak A, et al. ABC Raka Piersi. Biuletyn Wielkopolskiego Centrum Onkologii 2010.
- [3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase 2008;10.
- [4] Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2011 roku. "Rejestracja Nowotworów Złośliwych" Narodowego Programu Zwalczenia Chorób Nowotworowych 2013.
- [5] Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2007 roku. 2009.
- [6] Dyzmann-Sroka A, Harska A, Myślińska W, Olenderczyk W, Rymarczyk-Wciorko M, Szczęch B, et al. Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2007 roku. 2009.
- [7] Kordek R, Jassem J, Krzakowski M, Jeziorski A. Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Gdańsk: Medical Press; 2003.
- [8] Krzakowski M, Herman K, Jassem J, Jędrzejczak W, Kowalczyk JR, Podolak-Dawidziak M, et al. Onkologia w praktyce klinicznej. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Gdańsk 2007.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646-74.
- [10] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 2012;161:175-87.
- [11] Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. Nature reviews Cancer 2004;4:806-13.
- [12] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions. Molecular pharmaceutics 2010;7:1899-912.
- [13] Lammers T, Storm G, Kiessling F. Nanomedicine formulations for combination therapies. Nano reviews 2010;1.
- [14] Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? The Journal of pathology 2003;199:411-7.
- [15] Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, et al. Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2002;20:1467-72.
- [16] Lipton A, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Harvey HA, Chaudri-Ross HA, et al. Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy. Cancer 2005;104:257-63.
- [17] Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. The Journal of pathology 2003;200:290-7.
- [18] Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. Nature reviews Cancer 2009;9:463-75.
- [19] Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. Oncogene 2003;22:6570-8.
- [20] Tagliabue E, Balsari A, Campiglio M, Pupa SM. HER2 as a target for breast cancer therapy. Expert opinion on biological therapy 2010;10:711-24.
- [21] Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 2010;146:264-75.
- [22] Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2001;12 Suppl 1:S3-8.
- [23] Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2001;12 Suppl 1:S9-13.

- [24] Witton CJ. Structure of HER receptors and intracellular localisation of downstream effector elements gives insight into mechanism of tumour growth promotion. *Breast cancer research : BCR* 2003;5:206-7.
- [25] Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:1-13.
- [26] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
- [27] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The oncologist* 2003;8:307-25.
- [28] Engel RH, Kaklamani VG. HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. *Drugs* 2007;67:1329-41.
- [29] Koeppen HK, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO, et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001;38:96-104.
- [30] Pils D, Pinter A, Reibenwein J, Alfanz A, Horak P, Schmid BC, et al. In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *British journal of cancer* 2007;96:485-91.
- [31] Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Kramer A, Loibl S, Kaufmann M, et al. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia* 2004;6:786-95.
- [32] Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *Journal of the National Cancer Institute* 1993;85:1230-5.
- [33] Agus DB, Gordon MS, Taylor C, Natale RB, Karlan B, Mendelson DS, et al. Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:2534-43.
- [34] Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer cell* 2004;5:317-28.
- [35] Takai N, Jain A, Kawamata N, Popoviciu LM, Said JW, Whittaker S, et al. 2C4, a monoclonal antibody against HER2, disrupts the HER kinase signaling pathway and inhibits ovarian carcinoma cell growth. *Cancer* 2005;104:2701-8.
- [36] Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer cell* 2002;1:117-23.
- [37] Ross JS, Gray GS. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clinical leadership & management review : the journal of CLMA* 2003;17:333-40.
- [38] Spector NL, Yarden Y, Smith B, Lyass L, Trusk P, Pry K, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by human EGF receptor 2/EGF receptor tyrosine kinase inhibitor protects cardiac cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:10607-12.
- [39] Belimezi MM, Papanastassiou D, Merkouri E, Baxevanis CN, Mamalaki A. Growth inhibition of breast cancer cell lines overexpressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2006;55:1091-9.
- [40] Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002;8:1172-81.
- [41] Puri A, Kramer-Marek G, Campbell-Massa R, Yavlovich A, Tele SC, Lee SB, et al. HER2-specific affibody-conjugated thermosensitive liposomes (Affisomes) for improved delivery of anticancer agents. *Journal of liposome research* 2008;18:293-307.
- [42] Wang XF, Birringer M, Dong LF, Veprek P, Low P, Swettenham E, et al. A peptide conjugate of vitamin E succinate targets breast cancer cells with high ErbB2 expression. *Cancer research* 2007;67:3337-44.
- [43] Nielsen UB, Kirpotin DB, Pickering EM, Hong K, Park JW, Refaat Shalaby M, et al. Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochimica et biophysica acta* 2002;1591:109-18.
- [44] Goldstein D, Gofrit O, Nyska A, Benita S. Anti-HER2 cationic immunoemulsion as a potential targeted drug delivery system for the treatment of prostate cancer. *Cancer research* 2007;67:269-75.

- [45] Lee CH, Ni YH, Chen CC, Chou C, Chang FH. Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 2003;1611:55-62.
- [46] Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *International journal of nanomedicine* 2014;9:467-83.
- [47] Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society reviews* 2012;41:2885-911.
- [48] Kabanov AV, Gendelman HE. Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders. *Progress in polymer science* 2007;32:1054-82.
- [49] Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *The New England journal of medicine* 2010;363:2434-43.
- [50] Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology* 2007;2:751-60.
- [51] Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angewandte Chemie* 2009;48:872-97.
- [52] Zhang L, Chan JM, Gu FX, Rhee JW, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS nano* 2008;2:1696-702.
- [53] Andresen TL, Thompson DH, Kaasgaard T. Enzyme-triggered nanomedicine: drug release strategies in cancer therapy. *Molecular membrane biology* 2010;27:353-63.
- [54] Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery* 2008;7:771-82.
- [55] Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society reviews* 2012;41:2545-61.
- [56] Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews Cancer* 2005;5:161-71.
- [57] Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society reviews* 2012;41:2971-3010.
- [58] Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society reviews* 2013;42:1147-235.
- [59] Park JH, von Maltzahn G, Ong LL, Centrone A, Hatton TA, Ruoslahti E, et al. Cooperative nanoparticles for tumor detection and photothermally triggered drug delivery. *Advanced materials* 2010;22:880-5.
- [60] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters* 2010;10:3223-30.
- [61] Tanaka T, Decuzzi P, Cristofanilli M, Sakamoto JH, Tasciotti E, Robertson FM, et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomedical microdevices* 2009;11:49-63.
- [62] Zhang XQ, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swami A, Farokhzad OC. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews* 2012;64:1363-84.
- [63] Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews* 2014;66:2-25.
- [64] Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular membrane biology* 2010;27:286-98.
- [65] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- [66] Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *The cancer journal from Scientific American* 1998;4:209-17.
- [67] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced drug delivery reviews* 2013;65:71-9.
- [68] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2000;65:271-84.

- [69] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* 1986;46:6387-92.
- [70] Danquah MK, Zhang XA, Mahato RI. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced drug delivery reviews* 2011;63:623-39.
- [71] McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature medicine* 2003;9:713-25.
- [72] Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2001;74:7-25.
- [73] Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology* 2010;7:653-64.
- [74] Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic oncology* 2008;26:74-85.
- [75] Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie* 2010;49:6288-308.
- [76] Riggio C, Ciofani G, Raffa V, Cuschieri A, Micera S. Combination of polymer technology and carbon nanotube array for the development of an effective drug delivery system at cellular level. *Nanoscale research letters* 2009;4:668-73.
- [77] Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British journal of cancer* 2008;99:392-7.
- [78] Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate chemistry* 2010;21:797-802.
- [79] Maeda H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect. *Cancer science* 2013;104:779-89.
- [80] Farokhzad OC. Nanotechnology for drug delivery: the perfect partnership. *Expert opinion on drug delivery* 2008;5:927-9.
- [81] Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano* 2009;3:16-20.
- [82] Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2002;2:750-63.
- [83] Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of chemical research* 2011;44:1123-34.
- [84] Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society reviews* 2012;41:2718-39.
- [85] Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer research* 2006;66:6732-40.
- [86] Torchilin VP. Drug targeting. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2000;11 Suppl 2:S81-91.
- [87] Marcucci F, Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug discovery today* 2004;9:219-28.
- [88] Wu J, Nantz MH, Zern MA. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2002;7:d717-25.
- [89] Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 2000;6:443-6.
- [90] Cheng Z, Chen AK, Lee HY, Tsourkas A. Examination of folate-targeted liposomes with encapsulated poly(2-propylacrylic acid) as a pH-responsive nanoplatfrom for cytosolic drug delivery. *Small* 2010;6:1398-401.
- [91] Ding N, Lu Y, Lee RJ, Yang C, Huang L, Liu J, et al. Folate receptor-targeted fluorescent paramagnetic bimodal liposomes for tumor imaging. *International journal of nanomedicine* 2011;6:2513-20.
- [92] Seo HJ, Kim JC. 7-acetoxycoumarin dimer-incorporated and folate-decorated liposomes: photoresponsive release and in vitro targeting and efficacy. *Bioconjugate chemistry* 2014;25:533-42.
- [93] Wang H, Zhao P, Liang X, Gong X, Song T, Niu R, et al. Folate-PEG coated cationic modified chitosan--cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* 2010;31:4129-38.

- [94] Ye P, Zhang W, Yang T, Lu Y, Lu M, Gai Y, et al. Folate receptor-targeted liposomes enhanced the antitumor potency of imatinib through the combination of active targeting and molecular targeting. *International journal of nanomedicine* 2014;9:2167-78.
- [95] Zhao P, Wang H, Yu M, Cao S, Zhang F, Chang J, et al. Paclitaxel-loaded, folic-acid-targeted and TAT-peptide-conjugated polymeric liposomes: in vitro and in vivo evaluation. *Pharmaceutical research* 2010;27:1914-26.
- [96] Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clinical immunology* 2006;121:159-76.
- [97] Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clinical immunology* 2006;121:144-58.
- [98] Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological reviews* 2002;54:561-87.
- [99] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 2010;328:1031-5.
- [100] Vives E, Schmidt J, Pelegrin A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochimica et biophysica acta* 2008;1786:126-38.
- [101] Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology* 2010;188:759-68.
- [102] Leuschner C, Kumar CS, Hansel W, Soboyejo W, Zhou J, Hormes J. LHRH-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for detection of breast cancer metastases. *Breast cancer research and treatment* 2006;99:163-76.
- [103] Negussie AH, Yarmolenko PS, Partanen A, Ranjan A, Jacobs G, Woods D, et al. Formulation and characterisation of magnetic resonance imageable thermally sensitive liposomes for use with magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2011;27:140-55.
- [104] Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews Drug discovery* 2006;5:123-32.
- [105] Zhang Z, Chen J, Ding L, Jin H, Lovell JF, Corbin IR, et al. HDL-mimicking peptide-lipid nanoparticles with improved tumor targeting. *Small* 2010;6:430-7.
- [106] Rajendran L, Knolker HJ, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature reviews Drug discovery* 2010;9:29-42.
- [107] Yousif LF, Stewart KM, Kelley SO. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2009;10:1939-50.
- [108] Futaki S, Masui Y, Nakase I, Sugiura Y, Nakamura T, Kogure K, et al. Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide that improves the transfection efficiency of cationic liposomes. *The journal of gene medicine* 2005;7:1450-8.
- [109] Chen S, Zhuo RX, Cheng SX. Enhanced gene transfection with addition of a cell-penetrating peptide in substrate-mediated gene delivery. *The journal of gene medicine* 2010;12:705-13.
- [110] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Advanced drug delivery reviews* 2005;57:637-51.
- [111] Zhang Z, Cao W, Jin H, Lovell JF, Yang M, Ding L, et al. Biomimetic nanocarrier for direct cytosolic drug delivery. *Angewandte Chemie* 2009;48:9171-5.
- [112] Misra R, Sahoo SK. Intracellular trafficking of nuclear localization signal conjugated nanoparticles for cancer therapy. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2010;39:152-63.
- [113] Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, et al. Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer research* 1992;52:5144-53.
- [114] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998;279:377-80.

- [115] Mitra A, Mulholland J, Nan A, McNeill E, Ghandehari H, Line BR. Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005;102:191-201.
- [116] Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nature reviews Cancer* 2005;5:436-46.
- [117] Tagami T, Ernsting MJ, Li SD. Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011;152:303-9.
- [118] Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic delivery* 2012;3:457-78.
- [119] Sharma A, Jain N, Sareen R. Nanocarriers for diagnosis and targeting of breast cancer. *BioMed research international* 2013;2013:960821.
- [120] Soussan E, Cassel S, Blanzat M, Rico-Lattes I. Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie* 2009;48:274-88.
- [121] Abu Lila AS, Doi Y, Nakamura K, Ishida T, Kiwada H. Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010;142:167-73.
- [122] Torchilin VP. Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Current drug delivery* 2005;2:319-27.
- [123] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery* 2005;4:145-60.
- [124] Elbayoumi TA, Torchilin VP. Tumor-specific antibody-mediated targeted delivery of Doxil reduces the manifestation of auricular erythema side effect in mice. *International journal of pharmaceutics* 2008;357:272-9.
- [125] Matsumura Y, Hamaguchi T, Ura T, Muro K, Yamada Y, Shimada Y, et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *British journal of cancer* 2004;91:1775-81.
- [126] Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi FV, Nanjwade VK. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2009;38:185-96.
- [127] Gupta U, Dwivedi SK, Bid HK, Konwar R, Jain NK. Ligand anchored dendrimers based nanoconstructs for effective targeting to cancer cells. *International journal of pharmaceutics* 2010;393:185-96.
- [128] Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:7794-803.
- [129] Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 2003;2:347-60.
- [130] Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society reviews* 2012;41:2740-79.
- [131] Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie* 2010;49:3280-94.
- [132] Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, Cheng HK, et al. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications* 2011;47:5235-7.
- [133] Perche F, Torchilin VP. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of drug delivery* 2013;2013:705265.
- [134] Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* 2013;4:81-9.
- [135] Longmire MR, Ogawa M, Choyke PL, Kobayashi H. Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size. *Bioconjugate chemistry* 2011;22:993-1000.
- [136] Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* 2008;3:703-17.

- [137] Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011;153:198-205.
- [138] Lee DE, Koo H, Sun IC, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society reviews* 2012;41:2656-72.
- [139] Kwon S, Yang YS, Yang HS, Lee J, Kang MS, Lee BS, et al. Nasal and pulmonary toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats. *Toxicological research* 2012;28:217-24.
- [140] Sengupta J, Ghosh S, Datta P, Gomes A, Gomes A. Physiologically important metal nanoparticles and their toxicity. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2014;14:990-1006.
- [141] Walkey CD, Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews* 2012;41:2780-99.
- [142] Lewis RV. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chemical reviews* 2006;106:3762-74.
- [143] Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, Savage KN. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *The Journal of experimental biology* 1999;202:3295-303.
- [144] Newman J, Newman C. Oh what a tangled web: the medicinal uses of spider silk. *International journal of dermatology* 1995;34:290-2.
- [145] Vollrath F, Barth P, Basedow A, Engstrom W, List H. Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo. *In vivo* 2002;16:229-34.
- [146] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:401-16.
- [147] Blackledge TA, Kuntner M, Marhabaie M, Leeper TC, Agnarsson I. Biomaterial evolution parallels behavioral innovation in the origin of orb-like spider webs. *Scientific reports* 2012;2:833.
- [148] Eisoldt L, Thamm C, Scheibel T. Review the role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* 2012;97:355-61.
- [149] Lewicka M, Hermanson O, Rising AU. Recombinant spider silk matrices for neural stem cell cultures. *Biomaterials* 2012;33:7712-7.
- [150] Omenetto FG, Kaplan DL. SnapShot: Silk biomaterials. *Biomaterials* 2010;31:6119-20.
- [151] Asakura T, Umemura K, Nakazawa Y, Hirose H, Higham J, Knight D. Some observations on the structure and function of the spinning apparatus in the silkworm *Bombyx mori*. *Biomacromolecules* 2007;8:175-81.
- [152] Teule F, Addison B, Cooper AR, Ayon J, Henning RW, Benmore CJ, et al. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers* 2012;97:418-31.
- [153] Hayashi CY, Lewis RV. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science* 2000;287:1477-9.
- [154] Ittah S, Cohen S, Garty S, Cohn D, Gat U. An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* 2006;7:1790-5.
- [155] Hu X, Vasanthavada K, Kohler K, McNary S, Moore AM, Vierra CA. Molecular mechanisms of spider silk. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006;63:1986-99.
- [156] Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan DL. Structure-function-property-design interplay in biopolymers: spider silk. *Acta biomaterialia* 2014;10:1612-26.
- [157] Vollrath F, Madsen B, Shao Z. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 2001;268:2339-46.
- [158] Breslauer DN, Kaplan DL. Silks: properties and uses of natural and designed variants. *Biopolymers* 2012;97:319-21.
- [159] Dicko C, Kenney JM, Vollrath F. Beta-silks: enhancing and controlling aggregation. *Advances in protein chemistry* 2006;73:17-53.
- [160] Knight DP, Vollrath F. Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Die Naturwissenschaften* 2001;88:179-82.
- [161] Xu HT, Fan BL, Yu SY, Huang YH, Zhao ZH, Lian ZX, et al. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Animal biotechnology* 2007;18:1-12.
- [162] Perry DJ, Bittencourt D, Siltberg-Liberles J, Rech EL, Lewis RV. Piriform spider silk sequences reveal unique repetitive elements. *Biomacromolecules* 2010;11:3000-6.

- [163] Hu X, Yuan J, Wang X, Vasanthavada K, Falick AM, Jones PR, et al. Analysis of aqueous glue coating proteins on the silk fibers of the cob weaver, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 2007;46:3294-303.
- [164] Florczak A, Piekos K, Kazmierska K, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. [Engineered spider silk: the intelligent biomaterial of the future. Part I]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* 2011;65:377-88.
- [165] Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 2001;410:541-8.
- [166] Rising A, Nimmervoll H, Grip S, Fernandez-Arias A, Storckenfeldt E, Knight DP, et al. Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence. *Zoological science* 2005;22:273-81.
- [167] Spöner A, Schlott B, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weisshart K. Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry* 2005;44:4727-36.
- [168] Jin HJ, Kaplan DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 2003;424:1057-61.
- [169] Kluge JA, Rabotyagova O, Leisk GG, Kaplan DL. Spider silks and their applications. *Trends in biotechnology* 2008;26:244-51.
- [170] Knight DP, Knight MM, Vollrath F. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *International journal of biological macromolecules* 2000;27:205-10.
- [171] Rising A, Hjalms G, Engstrom W, Johansson J. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules* 2006;7:3120-4.
- [172] Heim M, Keerl D, Scheibel T. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angewandte Chemie* 2009;48:3584-96.
- [173] Spöner A, Unger E, Grosse F, Weisshart K. Differential polymerization of the two main protein components of dragline silk during fibre spinning. *Nature materials* 2005;4:772-5.
- [174] Spöner A, Vater W, Rommerskirch W, Vollrath F, Unger E, Grosse F, et al. The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochemical and biophysical research communications* 2005;338:897-902.
- [175] Mello CM, Soares JW, Arcidiacono S, Butler MM. Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins. *Biomacromolecules* 2004;5:1849-52.
- [176] Scheibel T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial cell factories* 2004;3:14.
- [177] Rising A, Widhe M, Johansson J, Hedhammar M. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011;68:169-84.
- [178] Gatesy J, Hayashi C, Motriuk D, Woods J, Lewis R. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* 2001;291:2603-5.
- [179] Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PloS one* 2007;2:e514.
- [180] Askarieh G, Hedhammar M, Nordling K, Saenz A, Casals C, Rising A, et al. Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* 2010;465:236-8.
- [181] Challis RJ, Goodacre SL, Hewitt GM. Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect molecular biology* 2006;15:45-56.
- [182] Hagn F, Eisoldt L, Hardy JG, Vendrely C, Coles M, Scheibel T, et al. A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* 2010;465:239-42.
- [183] Hedhammar M, Rising A, Grip S, Martinez AS, Nordling K, Casals C, et al. Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenoops australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry* 2008;47:3407-17.
- [184] Becker N, Oroudjev E, Mutz S, Cleveland JP, Hansma PK, Hayashi CY, et al. Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nature materials* 2003;2:278-83.
- [185] Fahnstock SR, Yao Z, Bedzyk LA. Microbial production of spider silk proteins. *Journal of biotechnology* 2000;74:105-19.
- [186] Tokareva O, Michalczychen-Lacerda VA, Rech EL, Kaplan DL. Recombinant DNA production of spider silk proteins. *Microbial biotechnology* 2013;6:651-63.
- [187] Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *Journal*

- of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 2009;4:17-27.
- [188] Brooks AE, Nelson SR, Jones JA, Koenig C, Hinman M, Stricker S, et al. Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico. *Nanotechnology, science and applications* 2008;1:9-16.
- [189] Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, Zhou JF, Duguay F, Chretien N, et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 2002;295:472-6.
- [190] Lewis RV, Hinman M, Kothakota S, Fournier MJ. Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein expression and purification* 1996;7:400-6.
- [191] Teule F, Cooper AR, Furin WA, Bittencourt D, Rech EL, Brooks A, et al. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nature protocols* 2009;4:341-55.
- [192] Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 1998;49:31-8.
- [193] Candelas GC, Arroyo G, Carrasco C, Dompenciel R. Spider silk glands contain a tissue-specific alanine tRNA that accumulates in vitro in response to the stimulus for silk protein synthesis. *Developmental biology* 1990;140:215-20.
- [194] Humenik M, Scheibel T, Smith A. Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber. *Progress in molecular biology and translational science* 2011;103:131-85.
- [195] Fahnstock SR, Bedzyk LA. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 1997;47:33-9.
- [196] Fahnstock SR, Irwin SL. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 1997;47:23-32.
- [197] Prince JT, McGrath KP, DiGirolamo CM, Kaplan DL. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* 1995;34:10879-85.
- [198] Bini E, Knight DP, Kaplan DL. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *Journal of molecular biology* 2004;335:27-40.
- [199] Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Protein-based block copolymers. *Biomacromolecules* 2011;12:269-89.
- [200] Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomasiewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *Journal of biomedical materials research Part A* 2013;101:456-64.
- [201] Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Self-assembly of genetically engineered spider silk block copolymers. *Biomacromolecules* 2009;10:229-36.
- [202] Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Role of polyalanine domains in beta-sheet formation in spider silk block copolymers. *Macromolecular bioscience* 2010;10:49-59.
- [203] Hueimmerich D, Scheibel T, Vollrath F, Cohen S, Gat U, Ittah S. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current biology : CB* 2004;14:2070-4.
- [204] Xia XX, Qian ZG, Ki CS, Park YH, Kaplan DL, Lee SY. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:14059-63.
- [205] Otzen D. The role of proteins in biosilicification. *Scientifica* 2012;2012:867562.
- [206] Spiess K, Lammel A, Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromolecular bioscience* 2010;10:998-1007.
- [207] Belton DJ, Mieszawska AJ, Currie HA, Kaplan DL, Perry CC. Silk-silica composites from genetically engineered chimeric proteins: materials properties correlate with silica condensation rate and colloidal stability of the proteins in aqueous solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2012;28:4373-81.
- [208] Mieszawska AJ, Furligas N, Georgakoudi I, Ouhib NM, Belton DJ, Perry CC, et al. Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials* 2010;31:8902-10.
- [209] Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 2006;27:4434-42.

- [210] Cao B, Mao C. Oriented nucleation of hydroxylapatite crystals on spider dragline silks. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2007;23:10701-5.
- [211] Huang J, Wong C, George A, Kaplan DL. The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* 2007;28:2358-67.
- [212] Xia XX, Wang M, Lin Y, Xu Q, Kaplan DL. Hydrophobic drug-triggered self-assembly of nanoparticles from silk-elastin-like protein polymers for drug delivery. *Biomacromolecules* 2014;15:908-14.
- [213] Xia XX, Xu Q, Hu X, Qin G, Kaplan DL. Tunable self-assembly of genetically engineered silk--elastin-like protein polymers. *Biomacromolecules* 2011;12:3844-50.
- [214] Gustafson JA, Ghandehari H. Silk-elastinlike protein polymers for matrix-mediated cancer gene therapy. *Advanced drug delivery reviews* 2010;62:1509-23.
- [215] Morgan AW, Roskov KE, Lin-Gibson S, Kaplan DL, Becker ML, Simon CG, Jr. Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2008;29:2556-63.
- [216] Numata K, Kaplan DL. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Advanced drug delivery reviews* 2010;62:1497-508.
- [217] Numata K, Hamasaki J, Subramanian B, Kaplan DL. Gene delivery mediated by recombinant silk proteins containing cationic and cell binding motifs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010;146:136-43.
- [218] Numata K, Kaplan DL. Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules* 2010;11:3189-95.
- [219] Gomes SC, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL. Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials* 2011;32:4255-66.
- [220] Numata K, Mieszawska-Czajkowska AJ, Kvenvold LA, Kaplan DL. Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromolecular bioscience* 2012;12:75-82.
- [221] Numata K, Reagan MR, Goldstein RH, Rosenblatt M, Kaplan DL. Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjugate chemistry* 2011;22:1605-10.
- [222] An B, Jenkins JE, Sampath S, Holland GP, Hinman M, Yarger JL, et al. Reproducing natural spider silks' copolymer behavior in synthetic silk mimics. *Biomacromolecules* 2012;13:3938-48.
- [223] Cui C, Xue YN, Wu M, Zhang Y, Yu P, Liu L, et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and antitumor efficacy of doxorubicin-loaded reduction-sensitive micelles. *Biomaterials* 2013;34:3858-69.
- [224] Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 2004;43:13604-12.
- [225] Menassa R, Zhu H, Karatzas CN, Lazaris A, Richman A, Brandle J. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant biotechnology journal* 2004;2:431-8.
- [226] Williams D. Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. *Medical device technology* 2003;14:9-11.
- [227] Wen H, Lan X, Zhang Y, Zhao T, Wang Y, Kajiura Z, et al. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Molecular biology reports* 2010;37:1815-21.
- [228] Xiao S, Stacklies W, Cetinkaya M, Markert B, Grater F. Mechanical response of silk crystalline units from force-distribution analysis. *Biophysical journal* 2009;96:3997-4005.
- [229] Breslauer DN, Lee LP, Muller SJ. Simulation of flow in the silk gland. *Biomacromolecules* 2009;10:49-57.
- [230] Kazmierska K, Florczak A, Piekos K, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. [Engineered spider silk: the intelligent biomaterial of the future. Part II]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* 2011;65:389-96.
- [231] Gronau G, Krishnaji ST, Kinahan ME, Giesa T, Wong JY, Kaplan DL, et al. A review of combined experimental and computational procedures for assessing biopolymer structure-process-property relationships. *Biomaterials* 2012;33:8240-55.

- [232] An B, Hinman MB, Holland GP, Yarger JL, Lewis RV. Inducing beta-sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. *Biomacromolecules* 2011;12:2375-81.
- [233] Bratzel G, Buehler MJ. Molecular mechanics of silk nanostructures under varied mechanical loading. *Biopolymers* 2012;97:408-17.
- [234] Kim UJ, Park J, Li C, Jin HJ, Valluzzi R, Kaplan DL. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* 2004;5:786-92.
- [235] Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Progress in polymer science* 2007;32:991-1007.
- [236] Widhe M, Bysell H, Nystedt S, Schenning I, Malmsten M, Johansson J, et al. Recombinant spider silk as matrices for cell culture. *Biomaterials* 2010;31:9575-85.
- [237] Bini E, Foo CW, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL. RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules* 2006;7:3139-45.
- [238] Scheller J, Henggeler D, Viviani A, Conrad U. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic research* 2004;13:51-7.
- [239] Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* 2004;5:718-26.
- [240] Widhe M, Johansson J, Hedhammar M, Rising A. Invited review current progress and limitations of spider silk for biomedical applications. *Biopolymers* 2012;97:468-78.
- [241] Lammel A, Schwab M, Hofer M, Winter G, Scheibel T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials* 2011;32:2233-40.
- [242] Lammel A, Schwab M, Slotta U, Winter G, Scheibel T. Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem* 2008;1:413-6.
- [243] Slotta UK, Rammensee S, Gorb S, Scheibel T. An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angewandte Chemie* 2008;47:4592-4.
- [244] Vendrely C, Scheibel T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular bioscience* 2007;7:401-9.
- [245] Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *Journal of biomedical materials research* 2001;54:139-48.
- [246] Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, et al. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *Journal of biomedical materials research Part A* 2003;67:559-70.
- [247] Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology* 2005;23:47-55.
- [248] Allmeling C, Jokuszies A, Reimers K, Kall S, Vogt PM. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006;10:770-7.
- [249] Seib FP, Kaplan DL. Doxorubicin-loaded silk films: drug-silk interactions and in vivo performance in human orthotopic breast cancer. *Biomaterials* 2012;33:8442-50.
- [250] Seib FP, Pritchard EM, Kaplan DL. Self-assembling doxorubicin silk hydrogels for the focal treatment of primary breast cancer. *Advanced functional materials* 2013;23:58-65.
- [251] Piechocki MP, Pilon SA, Wei WZ. Complementary antitumor immunity induced by plasmid DNA encoding secreted and cytoplasmic human ErbB-2. *Journal of immunology* 2001;167:3367-74.
- [252] Urbanelli L, Ronchini C, Fontana L, Menard S, Orlandi R, Monaci P. Targeted gene transduction of mammalian cells expressing the HER2/neu receptor by filamentous phage. *Journal of molecular biology* 2001;313:965-76.
- [253] Shadidi M, Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17:256-8.
- [254] Wang K, Guo L, Xiong W, Sun L, Zheng Y. Nanoparticles of star-like copolymer mannitol-functionalized poly(lactide)-vitamin E TPGS for delivery of paclitaxel to prostate cancer cells. *Journal of biomaterials applications* 2014.
- [255] Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5:1909-17.
- [256] Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews* 2010;62:284-304.
- [257] Yan AC, Levy M. Aptamers and aptamer targeted delivery. *RNA biology* 2009;6:316-20.

- [258] Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1994;1198:165-84.
- [259] Svensen N, Walton JG, Bradley M. Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends in pharmacological sciences* 2012;33:186-92.
- [260] Cheng H, Kastrup CJ, Ramanathan R, Siegwart DJ, Ma M, Bogatyrev SR, et al. Nanoparticulate cellular patches for cell-mediated tumor-tropic delivery. *ACS nano* 2010;4:625-31.
- [261] Smith B, Lyakhov I, Loomis K, Needle D, Baxa U, Yavlovich A, et al. Hyperthermia-triggered intracellular delivery of anticancer agent to HER2(+) cells by HER2-specific affibody (ZHER2-GS-Cys)-conjugated thermosensitive liposomes (HER2(+) affisomes). *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011;153:187-94.
- [262] Shishido T, Mieda H, Hwang SY, Nishimura Y, Tanaka T, Ogino C, et al. Affibody-displaying bionanocapsules for specific drug delivery to HER2-expressing cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2010;20:5726-31.
- [263] Shadidi M, Sioud M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2003;6:363-71.
- [264] Chiellini F, Piras AM, Errico C, Chiellini E. Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomedicine (Lond)* 2008;3:367-93.
- [265] Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* 2006;58:487-99.
- [266] Jansson R, Thatikonda N, Lindberg D, Rising A, Johansson J, Nygren PA, et al. Recombinant spider silk genetically functionalized with affinity domains. *Biomacromolecules* 2014;15:1696-706.
- [267] Numata K, Subramanian B, Currie HA, Kaplan DL. Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials* 2009;30:5775-84.
- [268] Subia B, Kundu SC. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers. *Nanotechnology* 2013;24:035103.
- [269] Wenk E, Wandrey AJ, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2008;132:26-34.
- [270] Seib FP, Jones GT, Rnjak-Kovacina J, Lin Y, Kaplan DL. pH-dependent anticancer drug release from silk nanoparticles. *Advanced healthcare materials* 2013;2:1606-11.
- [271] Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society* 2012;134:2139-47.
- [272] Kwon IK, Lee SC, Han B, Park K. Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012;164:108-14.
- [273] Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010;145:182-95.
- [274] Hofer M, Winter G, Myszczak J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials* 2012;33:1554-62.
- [275] Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 2010;6:12-21.
- [276] Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;353:26-32.
- [277] Mo LQ, Jia JH, Sun LJ, Wang QM. Solvent-induced intercluster rearrangements and the reversible luminescence responses in sulfide bridged gold(I)-silver(I) clusters. *Chemical communications* 2012;48:8691-3.
- [278] Denisso T, Kowalski DM. *Przegląd leków stosowanych w onkologii*. Warszawa: Borgis Wydawnictwo Medyczne; 2006.
- [279] Hedhammar M, Bramfeldt H, Baris T, Widhe M, Askarieh G, Nordling K, et al. Sterilized recombinant spider silk fibers of low pyrogenicity. *Biomacromolecules* 2010;11:953-9.
- [280] Chiang CS, Hu SH, Liao BJ, Chang YC, Chen SY. Enhancement of cancer therapy efficacy by trastuzumab-conjugated and pH-sensitive nanocapsules with the simultaneous encapsulation of

hydrophilic and hydrophobic compounds. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2014;10:99-107.

[281] Miao J, Du YZ, Yuan H, Zhang XG, Hu FQ. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2013;110:74-80.

[282] Patra HK, Ul Khaliq N, Romu T, Wiechec E, Borga M, Turner AP, et al. MRI-visual order-disorder micellar nanostructures for smart cancer theranostics. *Advanced healthcare materials* 2014;3:526-35.

[283] Yabbarov NG, Posypanova GA, Vorontsov EA, Obydenny SI, Severin ES. A new system for targeted delivery of doxorubicin into tumor cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013;168:135-41.

[284] Podlewski JK, Chwalibogowska-Podlewska A. Leki współczesnej terapii. *Medical Tribune* 2009;270-271:288-9.

[285] Głogowska I, Dubiański R, Skrzypczak A, Pieńkowski T. Rola antracyklin w leczeniu zaawansowanego raka piersi - miejsce niepegylowanej doksorubicyny liposomalnej. *Onkologia w praktyce klinicznej* 2010;supl A:A8-A17.

[286] Wilkers GM, Burton-Burke M. *Oncology nursing drug handbook*. Sudbury: Jones and Barlett Publishers; 2010.

[287] Szmit S, Grabowski M. Powikłania kardiologiczne leczenia raka piersi. *Terapia* 2008;16:46-55.

[288] Gabizon A, Isacson R, Libson E, Kaufman B, Uziely B, Catane R, et al. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta oncologica* 1994;33:779-86.

[289] Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2000;11:1029-33.

[290] Wang T, Hartner WC, Gillespie JW, Praveen KP, Yang S, Mei LA, et al. Enhanced tumor delivery and antitumor activity in vivo of liposomal doxorubicin modified with MCF-7-specific phage fusion protein. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2014;10:421-30.

[291] O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2004;15:440-9.

[292] Reynolds JG, Geretti E, Hendriks BS, Lee H, Leonard SC, Klinz SG, et al. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 2012;262:1-10.

[293] Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 2001;24:903-20.

[294] Ewer SM, Ewer MS. Cardiotoxicity profile of trastuzumab. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 2008;31:459-67.

[295] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 2001;344:783-92.

[296] Cortes J, Di Cosimo S, Climent MA, Cortes-Funes H, Lluch A, Gascon P, et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin (TLC-D99), paclitaxel, and trastuzumab in HER-2-overexpressing breast cancer: a multicenter phase I/II study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:307-14.

[297] Batist G, Harris L, Azarnia N, Lee LW, Daza-Ramirez P. Improved anti-tumor response rate with decreased cardiotoxicity of non-pegylated liposomal doxorubicin compared with conventional doxorubicin in first-line treatment of metastatic breast cancer in patients who had received prior adjuvant doxorubicin: results of a retrospective analysis. *Anti-cancer drugs* 2006;17:587-95.

[298] Mrozek E, Rhoades CA, Allen J, Hade EM, Shapiro CL. Phase I trial of liposomal encapsulated doxorubicin (Myocet; D-99) and weekly docetaxel in advanced breast cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2005;16:1087-93.

- [299] MacKay JA, Chen M, McDaniel JR, Liu W, Simnick AJ, Chilkoti A. Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection. *Nature materials* 2009;8:993-9.
- [300] Lv S, Li M, Tang Z, Song W, Sun H, Liu H, et al. Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy. *Acta biomaterialia* 2013;9:9330-42.
- [301] Zhen Z, Tang W, Chen H, Lin X, Todd T, Wang G, et al. RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors. *ACS nano* 2013;7:4830-7.
- [302] Kaminskis LM, McLeod VM, Kelly BD, Cullinane C, Sberna G, Williamson M, et al. Doxorubicin-conjugated PEGylated dendrimers show similar tumoricidal activity but lower systemic toxicity when compared to PEGylated liposome and solution formulations in mouse and rat tumor models. *Molecular pharmaceutics* 2012;9:422-32.
- [303] Yuan A, Wu J, Song C, Tang X, Qiao Q, Zhao L, et al. A novel self-assembly albumin nanocarrier for reducing doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *Journal of pharmaceutical sciences* 2013;102:1626-35.
- [304] Pramanik D, Campbell NR, Das S, Gupta S, Chenna V, Bisht S, et al. A composite polymer nanoparticle overcomes multidrug resistance and ameliorates doxorubicin-associated cardiomyopathy. *Oncotarget* 2012;3:640-50.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPÓLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Praca dofinansowana z projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Praca dofinansowana z programu „Międzynarodowe projekty doktoranckie” Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Poddziałanie Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.