

Katarzyna Jastrzębska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego jako
biokompatybilne nośniki leków**

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, 2015

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

*Serdecznie dziękuję koordynatorowi programu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie
Panu Prof. dr. hab. Stefanowi Jurdze za umożliwienie realizacji projektu, wsparcie i pomoc.*

*Bardzo serdecznie dziękuję Pani Promotor
dr. n. biol. Hannie Dams-Kozłowskiej za naukową opiekę i nieocenione wsparcie merytoryczne, ciągłą
motywację do pracy i rozwoju naukowego.*

*Dziękuję prof. dr Davidowi Kaplanowi
za naukową opiekę podczas stażu zagranicznego, wsparcie oraz cenne rady.*

Serdecznie dziękuję dr Annie Florczak, za owocną współpracę, wsparcie i życzliwość.

*Składam ogromne podziękowania Wszystkim, z którymi miałam przyjemność współpracować podczas
realizacji pracy doktorskiej, w szczególności prof. Maciejowi Kozakowi, dr Zuzannie Pietralik,
dr Barbarze Maciejewskiej, prof. Jackowi Gapińskiemu, dr Olenie Tokarewej, dr Yinnan Lin
dr Elizie Głównce, oraz dr Wojciechowi Białasowi.*

*Dziękuję Członkom Zespołu mgr Ewelinie Dondajewskiej i mgr Kamilowi Kucharczykowi za pomoc,
życzliwość i miłą atmosferę pracy.*

*Dziękuję Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Diagnostyki i Immunologii Nowotworów i
Katedry Biotechnologii Medycznej,
Koleżankom i Kolegom z Międzyuczelnianego Centrum NanoBioMedycznego
oraz Koleżankom i Kolegom z Wydziału Inżynierii Biomedycznej Uniwersytetu Tuftsa w Medford
za wsparcie, koleżeńskie rady i niezapomnianą atmosferę.*

*Szczególne podziękowania składam mojemu Mężowi za ogromne wsparcie, i nieograniczone pokłady
cierpliwości.*

Najbliższym



**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.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
1. Wstęp	8
1.1 Nośniki leków.....	8
1.1.1 Wprowadzenie.....	8
1.1.2 Rola nośników leku.....	9
1.1.2.1 Nieorganiczne nośniki leków	12
1.1.3 Polimerowe syntetyczne nośniki leków	13
1.1.4 Biopolimerowe nośniki leków	16
1.1.4.1 Biopolimery lipidowe.....	16
1.1.4.2 Biopolimery wielocukrowe	17
1.1.4.3 Biopolimery białkowe	18
1.1.4.4 Bioinżynierowane białka.....	20
1.2 Jedwab pajęczy	22
1.2.1 Właściwości jedwabiu pajęczego	22
1.2.2 Rodzaje jedwabi oraz ich rola.....	23
1.2.3 Struktura białek jedwabiu	24
1.2.4 Proces przędzenia pajęczych nici.....	26
1.2.5 Biotechnologiczna produkcja białek jedwabiu pajęczego.....	28
1.2.5.1 Produkcja białek jedwabi pajęczych w oparciu o cDNA spidroin.....	29
1.2.5.2 Produkcja bioinżynierowanych jedwabi pajęczych	30
1.2.5.3 Funkcjonalizacja bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.....	31
1.2.6 Oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.....	33
1.2.7 Formy strukturalne biomateriałów z jedwabiu pajęczego i ich zastosowania	34
1.2.7.1 Włókna	35
1.2.7.2 Filmy	36
1.2.7.3 Hydrożele.....	36
1.2.7.4 Rusztowania	37
1.2.7.5 Kapsułki	37
1.2.7.6 Sfery	38
1.3 Sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako nośniki leków.....	39

1.3.1	Sfery z bioinżynierowanego białka eADF4 (C16)	40
1.3.2	Kopolimery (<i>Block copolymers</i>)	42
1.3.3	Sfery z białka MS1	42
2.	Założenia i cel pracy	45
3.	Materiały i metody	46
3.1	Konstrukcja genów bioinżynierowanych jedwabi pajęczych	46
3.2	Ekspresja białek jedwabiu pajęczego	48
3.3	Oczyszczanie białek jedwabiu	49
3.3.1	Metoda termiczna	49
3.3.2	Metoda ekstrakcji kwasowej	49
3.4	Wytwarzanie sfer	50
3.4.1	Wytwarzanie sfer za pomocą pipety	50
3.4.2	Wytwarzanie za pomocą pomp strzykawkowych	50
3.5	Oczyszczanie sfer	51
3.6	Metody mikroskopowe	51
3.6.1	Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)	51
3.6.2	FIB (ang. <i>Focused Ion Beam</i>)	52
3.6.3	Konfokalna mikroskopia skaningowa	52
3.7	Pomiar potencjału dzeta	52
3.8	Dynamiczne rozpraszanie światła	53
3.9	Analiza rozmiaru sfer metodą śledzenia nanocząstek (ang. <i>Nanoparticle tracking</i>)	53
3.10	Spektroskopia FTIR	53
3.10.1	Pomiar rozpuszczalnego białka	53
3.10.2	Pomiar wodnej zawiesiny sfer	54
3.10.3	Pomiar liofilizowanych sfer w tabletkce KBr	54
3.10.4	Analiza danych	54
3.11	Spektroskopia Ramana	55
3.12	Dichroizm kołowy	55
3.13	Pomiary spektrofotometryczne stężenia białka oraz leku	56
3.14	Ładowanie leków do jedwabnych nośników	56
3.14.1	Ładowanie w trakcie wytwarzania sfer (PRE)	56
3.14.2	Ładowanie po wytworzeniu sfer (POST)	57
3.15	Uwalnianie leków	57
3.16	Hodowla komórkowa	57

3.17	Test żywotności komórek MTT.....	58
3.18	Test aktywacji makrofagów.....	58
3.19	Analiza statystyczna.....	58
4.	Wyniki.....	59
4.1	Konstrukcja wektorów ekspresyjnych pETNX-MS2.....	59
4.2	Produkcja bioinżynierowanych jedwabi pajęczych.....	64
4.3	Wpływ stosowanej metody oczyszczania białka na właściwości sfer.....	65
4.3.1	Metody oczyszczania.....	65
4.3.2	Właściwości rozpuszczalnego białka MS2(9x).....	66
4.3.2.1	Spektroskopia podczerwieni (FTIR).....	66
4.3.2.2	Spektroskopia Ramana.....	68
4.3.2.3	Dichroizm kołowy.....	68
4.3.2.4	Pomiar potencjału elektrokinetycznego (dzeta).....	69
4.3.3	Wytwarzane sfer.....	70
4.3.4	Analiza morfologii sfer MS2(9x) 80/20 i PA.....	70
4.3.5	Analiza rozmiaru sfer MS2(9x) 80/20 i PA.....	73
4.3.6	Analiza potencjału elektrokinetycznego sfer MS2(9x).....	77
4.3.7	Analiza struktury drugorzędowej sfer MS2(9x).....	79
4.3.7.1	Spektroskopia Ramana.....	79
4.3.7.2	Spektroskopia podczerwieni (FTIR).....	80
4.3.8	Badanie zdolności wiązania modelowych leków.....	81
4.4	Wpływ sekwencji bioinżynierowanego białka jedwabiu na właściwości sfer.....	82
4.4.1	Oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.....	82
4.4.2	Analiza morfologii sfer MS1 i MS2.....	83
4.4.3	Analiza rozmiaru sfer MS1 i MS2.....	85
4.4.4	Analiza potencjału elektrokinetycznego sfer MS1 i MS2.....	87
4.4.5	Analiza struktury drugorzędowej rozpuszczalnych białek oraz sfer.....	89
4.4.6	Inkorporacja chemioterapeutyków do sfer MS1 i MS2.....	91
4.4.7	Profile uwalniania chemioterapeutyków ze sfer MS1 i MS2.....	95
4.4.7.1	Uwalnianie ze sfer ładowanych metodą PRE.....	95
4.4.7.2	Uwalnianie ze sfer ładowanych metodą POST.....	95
4.4.7.3	Uwalnianie doksorubicyny zależne od pH.....	97
4.5	Automatyzacja produkcji jedwabnych nośników leku.....	99
4.5.1	Optymalizacja produkcji sfer za pomocą pomp strzykawkowych.....	99

4.5.2	Filtracja i odzyskiwanie sfer	104
4.6	Wytwarzanie sfer z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych.....	105
4.7	Biokompatybilność sfer	107
4.7.1	Cytotoksyczność sfer	107
4.7.2	Aktywacja makrofagów przez sfery MS1 i MS2	109
5.	Dyskusja.....	110
6.	Wnioski.....	128
7.	Streszczenie	129
8.	Abstract.....	132
9.	Literatura	135

Wykaz skrótów

- 80/20** – metoda oczyszczania białka za pomocą denaturacji termicznej
- A. diadematus** (łac. *Araneus diadematus*) – pająk krzyżak ogrodowy
- ADF** (ang. *Araneus diadematus fibroin*) – białko jedwabiu nici pająka krzyżaka ogrodowego
- ADIS** (ang. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) – zespół nabytego niedoboru odporności
- Ala** – alanina
- AP** (ang. *alkaline phosphatase*) – fosfataza alkaliczna
- APS** (ang. *ammonium peroxydisulfate*) – peroksydwusiarczan amonu
- ATR** – (ang. *attenuated total reflection*) – spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni
- B. mori** (łac. *Bombyx mori*) – jedwabnik morwowy
- BHK** (ang. *baby hamster kidney*) – linii komórek nerkowych chomika
- BSA** (ang. *bovine serum albumin*) – albumina bydlęca
- BSP** (ang. *bone sialoprotein*) – sialoproteina kości
- CCD** (ang. *Charge Coupled Device*) – rejestrator cyfrowy
- CDMP** (ang. *cartilage-derived morphogenetic proteins*) – chrząstkopochodne białko morfogenetyczne
- cDNA** (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA
- CLSM** (ang. *confocal laser scanning microscope*) – konfokalny laserowy mikroskop
- DLS** (ang. *dynamic light scattering*) – dynamiczne rozpraszanie światła
- DMEM** (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – modyfikowana pożywka hodowlana Eagla
- DMSO** (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- DNA** (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy
- dsDNA** (ang. *double-stranded deoxyribonucleic acid*) – dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy
- DSPC** (ang. *distearoyl-sn-glycerophosphocholine*) – distearoilofosfatydylocholina
- DSPE** (ang. *distearoyl-sn-glycerophosphoethanolamine*) – distearoilofosfatydyloetanolamina
- E. coli** (łac. *Escherichia coli*) – pałeczka okrężnicy
- eADF4** (ang. *engineered Araneus diadematus fibroin*) – bioinżynierowane białko jedwabiu krzyżaka ogrodowego
- eFLAG** (ang. *engineered flagelliform*) – bioinżynierowane białko jedwabiu łownego
- ELP** (ang. *elastin-like protein*) – bioinżynierowane białko elastyny
- EPR** (ang. *enhanced permeability and retention effect*) – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji
- eV** - elektronowolt
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca
- FDA** (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków
- FIB** (ang. *Focused Ion Beam*) – zogniskowana wiązka jonów
- FTIR** (ang. *Fourier transform infrared*) – spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera
- Gly** – glicyna

- GnRH** – (ang. *Gonadotropin-releasing hormone*) – hormone uwalniający gonadotropiny
- godz.** – godzina
- GRAVY** (ang. *Grand Average of Hydropathicity*) – współczynnik hydropatyczności
- HEK** (ang. *human embryonic kidney*) – linia ludzkich embrionalnych komórek nerki
- HEPES** (ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) – kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy
- HER** (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*) – receptor ludzkiego
- HFIP** (ang. *hexafluoroisopropanol*) – heksafluoroizopropanol
- hMSC** (ang. *human mesenchymal stem cells*) – linia ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych
- HNP** (ang. *human alpha defensin*) – defensyna
- IDP** (ang. *intrinsically disordered proteins*) – białka o natywnie nieuporządkowanej strukturze
- IgG** (ang. *immunoglobulin G*) – przeciwciało
- IPTG** (ang. *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) – izopropyl-β-D-1-
- kDa** (kilodalton) – jednostka masy molowej
- Km** – kanamycyna
- LB** (*Luria Bertani*) – pożywka do hodowli bakterii
- LPS** - lipopolisacharyd
- MAC-T** (ang. *bovine mammary epithelial cells*) – linia komórek nabłonka bydłych gruczołów piersiowych
- MALDI-TOF** (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*) – spektroskopia mas
- MaSp** (ang. *major ampullate spidroin*) – białko jedwabiu nici wiodącej mikrobiologicznej hodowli bakterii
- 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*
- MTT** (ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) – bromek dimetylotiazolodifenylotetrazoliowy
- N. clavipes*** (łac. *Nephila clavipes*) – złoty pająk jedwabny
- NIH** (ang. *National Institute of Health*) – amerykański instytut zdrowia
- OD** (ang. *optical density*) – gęstość optyczna
- P. pastoris*** (łac. *Pichia pastoris*) – drożdże
- PA** – metoda oczyszczania białka za pomocą ekstrakcji kwasem propionowym
- PBS** (ang. *phosphate buffered saline*) – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami
- PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- pDNA** (ang. *plasmid deoxyribonucleic acid*) – plazmidowy kwas deoksyrybonukleinowy
- PEEK** (ang. *Polyether ether ketone*) – polieteroeteroketon
- PEG** (ang. *polyethylene glycol*) – glikol polietylenowy
- PGA** (ang. *polyglycolic acid*) – kwas poli-l-glutaminowy
- PI** (ang. *polydispersity index*) – współczynnik polidispersyjności
- PLA** (ang. *polylactic acid*) – polimer kwasu polimlekowego
- PLGA** (ang. *poly(lactic-co-glycolic acid)*) – polimer kwasu mlekowego i glikolowego
- PMMA** (ang. *Poly(methyl methacrylate)*) – polimetakrylan metylu

- POST**- metoda ładowania leku polegająca na dodaniu leku po wytworzeniu nośnika
- PPII** (ang. *polyproline-II helix-like structures*) – poliprolinowe helisy typu II
- PRE** - metoda ładowania leku polegająca na dodaniu leku w trakcie wytwarzania nośnika
- pz** – par zasad
- RES** (ang. *reticuloendothelial system*) – system retikuloendotelialny
- RGD** (ang. *arginylglycylaspartic acid*) – tripeptyd (Arg-Gly-Asp) wiążący integryny
- RNA** (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy
- ryc.** – rycina
- 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 skaningowy
- SELPs** (ang. *silk elastin-like protein*) – bioinżynierowane białka oparte na sekwencji jedwabiu oraz elastyny
- Ser** – seryna
- SLPs** (ang. *silk-like proteins*) – bioinżynierowane białka jedwabiu
- SV40** – (ang. *Simian virus 40*) – domena kierująca do jądra komórkowego
- tab.** – tabela
- TAE** – bufor do elektroforezy DNA
- TLM** (ang. *translocation motif*) – peptyd penetrujący bonę komórkową
- TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik matrycy nowotworu
- tRNA** (ang. *transfer RNA*) – transportujący RNA
- UV** (ang. *ultraviolet*) – ultrafiolet
- Vis** – światło widzialne
- V** (wolt) – jednostka napięcia

1. Wstęp

1.1 Nośniki leków

1.1.1 Wprowadzenie

Standardowy sposób podania leku drogą doustną lub dożylną nie wykorzystuje w pełni możliwości terapeutycznych leku oraz naraża organizm na działania niepożądane powodowane przez terapeutyk lub produkty jego metabolizmu. Substancja lecznicza oddziałuje na cały organizm, a tylko niewielka część aplikowanej dawki dociera do miejsca przeznaczenia (1). W celu uzyskania pożądanego efektu, konieczne jest zwiększenie dawki lub częstości podań leku. Może to być potencjalnie niebezpieczne szczególnie w przypadku leków o niskim indeksie terapeutycznym.

Zastosowanie nośników leku umożliwiają akumulację substancji leczniczej w miejscu przeznaczenia oraz jej ciągłe i przedłużone uwalnianie. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie stałego poziomu leku w miejscu jego działania przy jednoczesnym zmniejszeniu częstości podań (2). Zastosowanie nośników otwiera również możliwości dostarczania terapeutyków, które ulegają degradacji lub tracą aktywność w krwiobiegu: białek, enzymów czy kwasów nukleinowych. Funkcja ochronna pełniona przez nośnik zwiększa stabilność i tym samym okres półtrwania tych substancji w organizmie (3). Nośniki poprawiają także biodostępność i zmniejszają toksyczność leków trudno rozpuszczalnych w wodzie (4,5).

W obliczu ogromnych korzyści terapeutycznych, jakie niesie za sobą zastosowanie nośników substancji aktywnych, uwaga wielu badaczy koncentruje się na rozwoju celowanych nano-nośników zbudowanych z cząstek nieorganicznych, polimerów syntetycznych, oraz biopolimerów naturalnych i bioinżynierowanych (6–8). Przez ostatnie pół wieku, ogromny postęp w tej dziedzinie dokonał się dzięki opracowaniu nowych materiałów tworzących nośniki o kontrolowalnych właściwościach takich jak rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy czy wytrzymałość mechaniczna. Jednocześnie, do rozwoju tej dziedziny przyczynił się wzrost wiedzy o interakcjach nośników z systemami biologicznymi na poziomie organizmu, poszczególnych organów, tkanek oraz pojedynczych komórek.

1.1.2 Rola nośników leku

Jednym z najważniejszych warunków efektywności nośnika leku jest zdolność dotarcia do miejsca przeznaczenia, akumulacji oraz przedłużonego uwalniania leku. Organizm człowieka stawia przed nośnikiem leku szereg barier. Cząstki „idealnego” nośnika podawanego dożylnie muszą być stabilne w krwiobiegu, uniknąć wychwytu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES), oraz nie wykazywać przedwczesnego uwalniania substancji terapeutycznej (9). Nośniki o charakterze hydrofobowym mogą ulec opsonizacji białkami należącymi do układu dopełniacza lub przeciwciałami, co indukuje fagocytozę przez makrofagi lub neutrofile. Szacuje się, że większość opsonizowanych cząstek jest eliminowanych z krwiobiegu przez wątrobę i śledzionę w przeciągu 5 minut od podania (10). Zjawisku temu zapobiec można poprzez otaczanie nośników hydrofilowymi polimerami takimi jak glikol polietylenowy (PEG) (11). Bardzo trudną do przebycia barierę stanowi śródbłonek naczyń włosowatych, przez które nośnik musi przedostać się do wnętrza tkanki. Luźniejsze przestrzenie międzykomórkowe w śródbłonku naczyń włosowatych wątroby i śledziony sprawiają, że większość nośników akumuluje się właśnie w tych narządach. Wyjątek stanowią nieprawidłowe naczynia włosowate w obrębie zmiany nowotworowej gdzie nieszczelny śródbłonek pozwala na ucieczkę z krwiobiegu większym cząstkom (12). Szacuje się, iż rozmiar porów pomiędzy komórkami śródbłonka naczyń guza waha się od 200 do 600 nm. Dodatkowo, nieprawidłowe naczynia limfatyczne w tkance nowotworu przyczynia się do akumulacji cząstek w obrębie guza. Zjawisko to nosi nazwę efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji – EPR (ang. *Enhanced Permeability and Retention*) (13). Akumulacja nanonośników zawierających lek w guzie dzięki efektowi EPR pozwala na częściową (bierną) swoistość terapii przeciwnowotworowej poprzez zwiększenie dawki terapeutyku w środowisku guza w stosunku do innych tkanek (14). Inne systemy dostarczania bazują na strategii czynnego dostarczania leku, która polega na swoistych oddziaływaniach nanonośników zawierających lek z receptorami występującymi na powierzchni określonych typów komórek. Transport aktywny nośnika do tych komórek może odbywać się przy zastosowaniu mechanizmu ligand-receptor lub przeciwciało-antygen. Aby system dostarczania leków był swoisty, niezbędna jest koniugacja powierzchni nanonośnika z cząsteczkami rozpoznającymi dany receptor. Strategia ta gwarantuje swoistość terapii, a w konsekwencji zmniejszenie skutków ubocznych oraz wzrost efektywności leczenia (15).

Szczególne zapotrzebowanie na nośniki leków występuje w przypadku chorób nowotworowych. Chemioterapeutyki należą do leków o niskim indeksie terapeutycznym oraz wykazują szereg działań niepożądanych. Duża z nich część to substancje trudno rozpuszczalne w

wodzie (16). Terapia nowotworów stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. W Polsce choroba nowotworowa jest obecnie przyczyną około 20% wszystkich zgonów, w tym około 40% zgonów u kobiet w wieku 45-65 lat i 30% zgonów u mężczyzn w wieku 45-65 lat (17). Główne metody terapii nowotworów obejmują chirurgiczne usunięcie guza, radioterapię, chemioterapię oraz immunoterapię. Współczesna chemioterapia to najczęściej skojarzenie i podanie kilku cytostatyków jednocześnie. Intensywne badania mające na celu udoskonalenie terapii cytostatykami doprowadziły w ostatnim czasie do znaczącej poprawy przeżywalności pacjentów, jednakże problemem pozostaje nadal wysoka toksyczność i poważne działania niepożądane, co wiąże się ze znacznym pogorszeniem jakości życia chorych (18).

Przez ostatnie dziesięciolecia opracowano szereg typów nośników i systemów ukierunkowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych. Jako główne z nich można wymienić nieorganiczne nanocząstki, nanocząstki z syntetycznych polimerów oraz nanocząstki wytworzone z biopolimerów. Niektóre z tych innowacyjnych formułacji zostały dopuszczone do użycia w terapii nowotworów (tabela nr 1.1.) natomiast wiele znajduje się w różnych fazach badań klinicznych.

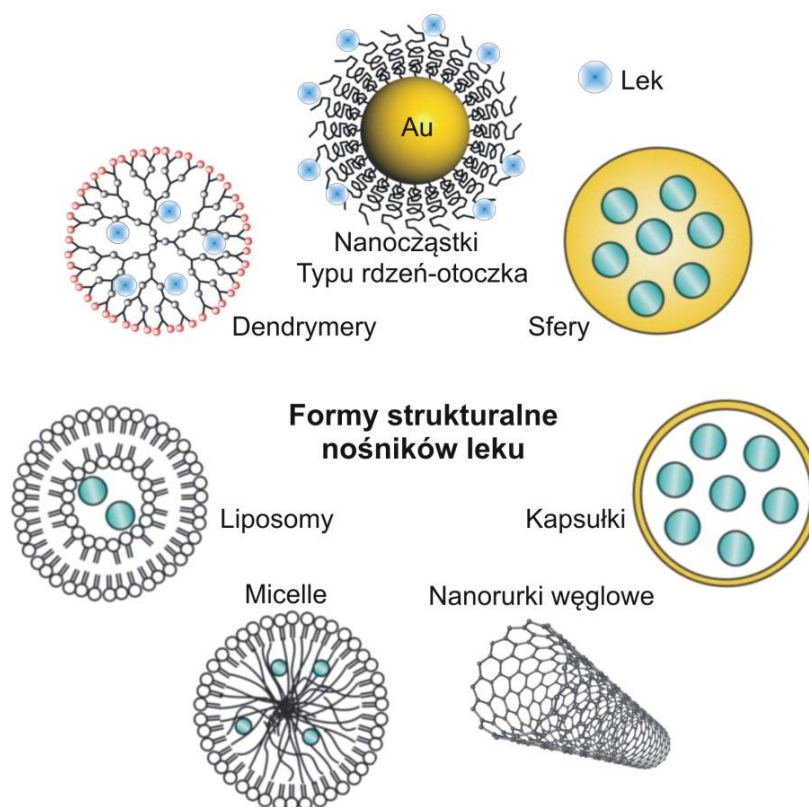
Tabela 1.1. Innowacyjne nanonośniki leku stosowane w terapii nowotworów. Źródło: (19) (zmienione)

Nazwa produktu	Substancja czynna	Typ nośnika	Producent
Daunoxome	Cytrynian daunorubicyny	Liposomy	Gilead Science, Cambridge Wielka Brytania
Doxil	Dokсорubicyna HCl	Liposomy	Johnson and Johnson, NJ, Stany Zjednoczone
Myocet	Dokсорubicyna	Liposomy	Sopherion Therapeutics, NJ, Stany Zjednoczone
Caelyx	Dokсорubicyna HCl	PEGyłowane liposomy	Johnson and Johnson, NJ, Stany Zjednoczone
Transdrug	Dokсорubicyna	Nanocząstki poliakryloylanoakrylatu	BioAlliance, Paryż, Francja
Genexol-PM	Paklitaksel	Nanocząstki metoksy-PEGyłowanego polimleczanu	Samyang, Korea Południowa
Oncaspar	Pegaspargaza	Nanocząstki PEGyłowanej asparaginazy	Enzon, NJ, Stany Zjednoczone
Abraxane	Paklitaksel	Nanocząstki albuminy	American Bioscience, CA, Stany Zjednoczone

Materiał, z którego wykonany jest nośnik wpływa na jego rozmiar, kształt, ładunek, efektywność ładowania leku, kinetykę uwalniania, a także jego stabilność we krwi, dystrybucję w organizmie oraz drogę wnikania do komórek (20). Materiał tworzący nośnik leku powinien

spełniać szereg warunków: 1) musi być biokompatybilny, biodegradowalny oraz nietoksyczny dla organizmu; 2) musi być zdolny do inkorporacji leku i opóźnionego bądź kontrolowanego uwalniania; 3) powinien zapewnić ochronę dla substancji aktywnej przed degradacją; 4) powinien być podatny na modyfikacje pozwalające na ukierunkowane dostarczanie leku; 5) proces pozyskiwania oraz wytwarzania nośnika powinien być łatwy, tani oraz powtarzalny (21).

Obecnie, badania nad innowacyjnymi materiałami skupiają się na projektowaniu i otrzymaniu nośników o ściśle określonych, pożądanych właściwościach. Badane są różne formy nośników: nanocząstki, sfery, kapsułki, dendrymery, micelle, liposomy, a także nanorurki węglowe (ryc.1). Do ich wytwarzania wykorzystywane są różne klasy związków, w tym materiały nieorganiczne, syntetycznie polimery, biopolimery naturalne oraz bioinżynierowane.



Rycina 1. Formy strukturalne nośników leku

1.1.2.1 Nieorganiczne nośniki leków

Nieorganiczne nośniki leków, mogą być zbudowane z metali takich jak złoto, srebro czy żelazo oraz ich tlenków lub siarczków. Występują one najczęściej w postaci nanocząstek o średnicy ok. 20 – 50 nm. (22,23). Ich wspólną cechą jest budowa o strukturze: rdzeń – otoczka, gdzie rdzeń stanowi właściwa nanocząstka, której powierzchnia kowalencyjnie bądź elektrostatycznie wiązana jest z polimerem, lekiem lub innymi biologicznie aktywnymi cząsteczkami (np. przeciwciałami). Najczęściej stosowaną modyfikacją nanocząstek jest koniugacja z glikolem polietylenowy (PEG). Modyfikacja ta poprawia biokompatybilność nośników, redukuje ich zdolność do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej oraz ogranicza fagocytozę tych cząstek przez RES, tym samym przedłuża czas eliminacji z organizmu (10,24,25).

Metaliczne nanocząstki złota posiadają ujemny ładunek powierzchniowy, oraz wysoką reaktywność, dzięki czemu łatwo poddają się funkcjonalizacji (26). Mogą one służyć nie tylko jako nośnik leku, ale także jako narzędzie diagnostyczne, czynnik do obrazowania *in vitro* oraz *in vivo*. Mogą również pełnić rolę czynnika terapeutycznego w metodzie zwanej terapią fototermalną (27,28). Szerokie możliwości funkcjonalizacji powierzchni tych nanocząstek poprzez kowalencyjną koniugację z dowolnym terapeutycznym nadają im właściwości uniwersalnego nośnika (6). Dotychczas jedynym znanym preparatem przeciwnowotworowym wykorzystującym nanocząstki złota będącym w fazie badań klinicznych jest preparat Aurimune (CYT-6091); są to PEG-yłowane nanocząstki złota skoniugowane z czynnikiem martwicy nowotworu (TNF) – cytokiną hamującą wzrost komórek nowotworowych (29). Interesującym przykładem nieorganicznych nośników leku o budowie rdzeń-otoczka są nanocząstki tlenku żelaza o właściwościach magnetycznych (30). Cząstki te posiadają hydrofobową powierzchnię, wymagającą opłaszczenia amfifilowym polimerem w celu stabilizacji (31). Strategia terapii przy użyciu nanocząstek magnetycznych polega na koniugowaniu leku przez opłaszczone ich polimerem. Nanocząstki te są podawane dożylnie i są kumulowane w określonym regionie np. w obrębie zmiany nowotworowej przez przyłożenie lokalnego pola magnetycznego (32).

Kolejną grupę nieorganicznych nośników leku stanowią nanocząstki ceramiczne złożone z tlenków aluminium, tlenku tytanu czy krzemionki (33,34). Dzięki swojej porowatej strukturze nadają się do dostarczania leków wielkocząsteczkowych takich jak np. enzymy. Materiały te są nietoksyczne, a mały rozmiar (do 50 nm) pozwala na uniknięcie ich wychwytywania przez RES (35,36).

Osobną klasę nośników leku stanowią nanorurki węglowe. Nanorurki to alotropowe odmiany węgla mające postać walców o średnicy rzędu nanometrów, powstałych ze zwiniętej jednoatomowej płaszczyzny grafenu (37) (ryc. 1). Funkcjonalizacja powierzchni nanorurek jest możliwa dzięki dostępności wielu miejsc kowalencyjnego i niekowalencyjnego wiązania substancji aktywnych na heksagonalnej siatce atomów węgla (38). Funkcjonalizacja stabilizuje te struktury i nadaje im biokompatybilność, a ich naturalne właściwości takie jak kształt i ładunek ułatwiają przechodzenie przez błony komórkowe (39,40).

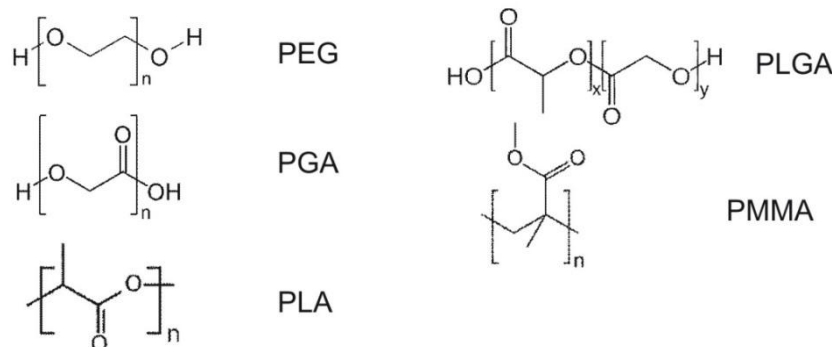
Zaletami nieorganicznych nanocząstek jest ich niewielki rozmiar, stosunkowo prosta metoda syntezy i możliwość modyfikacji ich powierzchni. Należy jednak pamiętać o toksyczności, jaką nośniki te mogą wykazywać. Akumulacja niedegradowalnych nanocząstek, jakimi są nanocząstki nieorganiczne może doprowadzić do przewlekłego stanu zapalnego tkanek (41). Istnieją doniesienia, iż dodatnio naładowane nanocząstki złota powodowały hemolizę oraz powstawanie skrzepów krwi (42). Uważane za biokompatybilne nanorurki węglowe mogą powodować agregację i aktywację płytek krwi (43). Wzrastającą wraz z wysokością dawki i czasem ekspozycji toksyczność wykazały także nanocząstki krzemionkowe. Miały one wpływ na wzrost stężenia wolnych rodników i obniżenie poziomu glutationu w tkankach, co wskazuje na wywoływany przez nie stres oksydacyjny (44). Nieorganiczne nanocząstki mogą również powodować uszkodzenia błon komórkowych oraz mitochondriów, w szczególności komórek śródbłonna (45). Powyższe doniesienia wskazują, iż systemy te wymagają dalszego udoskonalenia i wieloletnich badań nad ich działaniami niepożądanymi.

1.1.3 Polimerowe syntetyczne nośniki leków

W odróżnieniu od nanocząstek nieorganicznych, większość polimerowych nośników leku to substancje biodegradowalne. Zbudowane są one z syntetycznych łańcuchów polimerowych. Syntetyczne polimery najczęściej używane to m. in. kopolimery kwasu poliglikolowego i polimlekowego (PLGA), poliglikolidu (PGA) kwasu polimlekowego (PLA), poliakrylocjanoakrylanów (PCA) oraz polimetakrylanu metylu (PMMA). Glikol polietylenowy, stosowany jest natomiast jako modyfikacja powierzchni nośnika leku. Monomery związków najczęściej wykorzystywanych do produkcji tego typu nośników przedstawiono na rycinie 2. W zależności od budowy polimeru oraz metody wytwarzania syntetyczne polimerowe nośniki mogą występować pod postacią sfer i kapsulek, dendrymerów oraz micelli (ryc.1). W zależności od użytego materiału mogą na drodze różnych mechanizmów uwalniać leki. Można podzielić je

na polimery uwalniające lek pod wpływem dyfuzji, pod wpływem rozpuszczalnika (w wyniku puchnięcia polimeru lub działającego ciśnienia osmotycznego), polimery uwalniające lek na skutek degradacji chemicznej i biodegradacji enzymatycznej oraz polimery wrażliwe na czynniki środowiskowe. Te ostatnie uwalniają lek na skutek zmiany charakterystycznego czynnika takiego jak: pH, temperatura, siła jonowa czy potencjał redox (4).

Polimery syntetyczne



Rycina 2. Syntetyczne polimery wykorzystywane do wytwarzania nośników leku.

Przykładami nośników z polimeru syntetycznego są nanosfery zbudowane z PLGA. Przeciwnowotworowy lek paklitaksel uwalniany w kontrolowany sposób z tych nanocząstek wykazywał większą skuteczność niż rozpuszczalna forma leku (46). Kolejny przykład stanowią nanosfery z PLGA załadowane winkrystyną wraz z werapamilem (substancją uwrażliwiającą komórki na działanie chemioterapeutyku). Nanocząstki te stopniowo uwalniały obie substancje po wnikięciu do komórek MCF7/ADR. Komórki te były odporne na winkrystynę, jednakże dodanie werapamilu wykazało efektywne działanie przeciwnowotworowe *in vitro* (47). Pierwszymi polimerowymi nośnikami, które zostały zaakceptowane przez FDA były mikrosfery z PLGA z zainkorporowanym octanem leuproreliny (agonista gonadoliberyny – GnRH), które zostały zarejestrowane w roku 1985 pod nazwą Lupron Depot®. Wprowadzenie tego preparatu pozwoliło na znaczne zmniejszenie częstość podania leku, co wpłynęło na poprawę komfortu życia chorych leczonych z powodu endometriozy oraz zaawansowanego raka stercza (48).

Kopolimery o strukturze amfifilowej, czyli posiadające w swojej strukturze bloki o właściwościach hydrofilowych i hydrofobowych, spontanicznie układają się w micelle wielkości od 20 do 100 nm (49). W roztworach wodnych bloki hydrofilowe tworzą zewnętrzną otoczkę, a hydrofobowe – rdzeń micelli. Odpowiedni dobór polimerów tworzących micelle pozwala na uzyskanie kontrolowanych systemów uwalniania substancji leczniczych, pod

wpływem zmian temperatury lub pH. Podobnie jak inne nanoosiłniki, micelle mogą zostać zmodyfikowane powierzchniowo poprzez powiązanie z ligandami (50,51). Z uwagi na swoją biokompatybilność najczęściej stosowanym blokiem hydrofilowym jest glikol polietylenowy (51). Zaletą tego systemu jest zdolność do bardzo efektywnej enkapsulacji leków lipofilowych i trudno rozpuszczalnych w wodzie. Zamknięcie ich w polimerowej micelli powoduje poprawę biodostępności oraz redukcję toksyczności (52). Powyższe nośniki mogą skutecznie dostarczać do komórek leki chemiczne, takie jak doksorubicyna, antracykliny (53,54) paklitaksel (50), etopozyd, tamoksifen lub kamptotecyna (55). Przykładowo, adriamycyna zamknięta w formie polimerowych micelli wykazała silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż rozpuszczalna forma tego leku w mysim modelu gruczolaka (56).

Polimery o rozgałęzionej budowie tworzą nanocząstki nazywane dendrymerami (57). Polimerami najczęściej stosowanymi do ich produkcji są poliamidoaminy (PAMAM), rzadziej natomiast poliaminy, poliamidy, etery poliarylowe czy też poliestry (29,58). Łańcuchy tworzące polimery (dendrony) rozchodzą się promieniście ze środka cząstki, a następnie rozgałęziają się tworząc wieloramienną powłokę (ryc. 1). W ich budowie można wyróżnić trzy warstwy: wewnętrzny rdzeń dendrymeru, do którego przymocowane są dendrony, warstwę środkową czyli dendrony połączone bezpośrednio z rdzeniem oraz zewnętrzną tworzącą powierzchnię o wielu miejscach wiązań dla leków lub innych funkcjonalnych molekuł (22,29). Jednym z pierwszych przykładów użycia dendrymerów jako nośnika leku było przyłączenie cisplatyny do powierzchni dendrymeru PAMAM (57). W porównaniu z wolną cisplatyną, dendrymerowe koniugaty leku gwarantowały przedłużone działanie tego leku, większą akumulację w środowisku guza oraz mniejszą toksyczność *in vivo* (57). W połączeniu z dendrymerami stosowano też fluorouracyl, metotreksat, doxorubicynę czy ibuprofen (59).

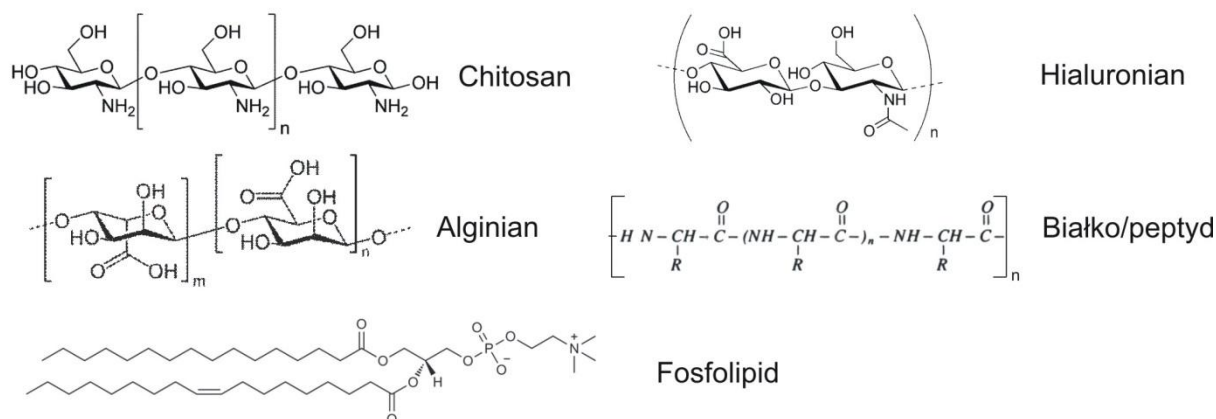
Syntetyczne polimery umożliwiają precyzyjną kontrolę właściwości nośników i umożliwiają ich modyfikację przy zachowaniu biokompatybilności i biodegradowalności systemu dostarczania leków. Potencjalna toksyczność tych materiałów może być jednak związana z sposobem otrzymywania polimerowych nośników. Związki te bardzo często wymagają zastosowania toksycznych środków sieciujących w procesie polimeryzacji. Pozostałości tych związków uwięzionych w sieci polimeru mogą uwalniać się podczas biodegradacji nośnika i wywoływać efekt cytotoksyczny. Ponadto nośniki te zazwyczaj wymagają użycia rozpuszczalników organicznych w procesie ich wytwarzania, co uniemożliwia inkorporację niektórych terapeutyków, np. peptydów i białek. (60,61). Co więcej, produkty

degradacji polimerów: kwas mlekowy i glikolowy mogą spowodować miejscowe znaczne obniżenie pH i wzrost ciśnienia osmotycznego (62).

1.1.4 Biopolimerowe nośniki leków

Zastosowanie naturalnych polimerów jako nośniki leku daje gwarancję biokompatybilności i biodegradowalności oraz całkowitej absorpcji produktów rozpadu nośnika przez organizm. Wytwarzanie większości biopolimerowych nośników przebiega również w biokompatybilnych warunkach, bez rozpuszczalników organicznych, co dodatkowo zapewnia ich nietoksyczność. Wśród naturalnych biomateriałów mających zastosowanie jako nośniki leku wyróżnić można polimery lipidowe, wielocukrowe, oraz białkowe (19) (ryc. 3).

Polimery naturalne



Rycina 3. Biopolimery wykorzystywane do wytwarzania nośników leku.

1.1.4.1 Biopolimery lipidowe

Nośniki zbudowane z dwuwarstwy lipidowej to liposomy (ryc.1) (63). Ich zaletami są biokompatybilność, amfifilowy charakter oraz możliwość modyfikacji powierzchni. Stanowią doskonały nośnik dla większych molekuł takich jak białka i peptydy. Mogą one stanowić nośnik substancji hydro- oraz lipofilowych (64). Przykładem liposomowych formuacji leku, które odniosły sukces komercyjny są preparaty Doxil® i DaunoXome® (19,48). Doxil – liposomowa formuacja doksorubicyny została zatwierdzona przez FDA w latach 90 tych ubiegłego wieku do terapii mięsaka Kaposiego oraz raka jajnika. Liposomy z PEG-yłowanej distearoilofosfatydyloetanolaminy (PEG-DSPE) użyte w tym preparacie wydłużyły okres półtrwania leku w krwiobiegu z 10 do 45 godzin oraz zwiększyły akumulację leku w obrębie guza od 4 do 16

razy w porównaniu do wolnej doksorubicyny (65). DaunoXome® zawiera wodny roztwór daunorubicyny enkapsulowany do liposomów zbudowanych z dwuwarstwy distearoilofosfatydylocholiny (DSPC) oraz cholesterolu o średnicy ok 45 nm. Preparat ten został zarejestrowany do terapii mięsaka Kaposiego związanego z chorobą ADIS (48).

1.1.4.2 Biopolimery wielocukrowe

Wielocukry najczęściej stosowane jako nośniki leków to chitosan, alginian oraz hialuronian (66). Ich wspólnymi cechami są dobre właściwości mechaniczne, biokompatybilność, biodegradowalność, brak toksyczności oraz brak immunogenności. Nośniki z naturalnych biopolimerów wytwarzane są najczęściej w formie mikro- i nanosfer.

Chitosan to dodatnio naładowany wielocukier który posiada w swej strukturze wolne grupy aminowe, stanowiące potencjalne miejsca modyfikacji i funkcjonalizacji. Otrzymywany jest na drodze deacetylacji chityny, która jest pozyskiwana z osłonek morskich skorupiaków (67). Chitosan ma powinowactwo do błon śluzowych, nie powoduje reakcji alergicznych organizmu oraz rozkłada się na nieszkodliwe aminocukry (68). Ponadto, może być on poddawany sterylizacji metodą parową, gazową oraz promieniowaniem jonizującym (69). Materiał ten jest szeroko wykorzystywany w rozwoju nowych systemów dostarczania leku (70–72), w szczególności celujących w błony śluzowe (66), w tym systemów opartych na mikrosferach (69,72–75). Prowadzone także są badania nad nośnikami leków przeciwnowotworowych opartych na chitosanie. Przykładowo, nanocząstki chitosanu załadowane modelowym lekiem cytotoksycznym – brucyną swoiście skierowane do mitochondriów wykazały zwiększoną skuteczność przeciwnowotworową oraz przedłużone działanie leku (76).

Alginiany są hydrokolidami używanymi najczęściej do żelowania i stabilizacji formulacji leku oraz produktów spożywczych. Otrzymuje się je z wodorostów lub niektórych szczepów bakteryjnych (77). Żel alginianowy jest stabilny, obojętny chemicznie i ma strukturę mikroporowatą, nadaje się więc do enkapsulacji enzymów i innych wielkocząsteczkowych substancji aktywnych. Ponadto, może on oddziaływać zarówno z hydrofilowymi jak i hydrofobowymi lekami zapewniając ich opóźnione uwalnianie (78). Zmiany pH wpływają na lepkość tych żeli, co umożliwia kontrolę nad kinetyką uwalniania poprzez zmiany odczynu środowiska. Alginianowe mikro- i nanosfery do dostarczania leków można łatwo wytwarzać indukując proces żelowania jonami wapnia, przy równoczesnym mieszaniu (78–80). Wykazano,

iz alginianowe micelle załadowane doksorubicyną akumulują się w obrębie guza dzięki efektowi EPR oraz wykazują skuteczność przeciwnowotworową przy zmniejszonej ogólnoustrojowej toksyczności w mysim modelu guza (81). Do produkcji sfer i nanocząstek często stosuje się także mieszanki alginianów z chitosanem (79).

Kolejny biopolimer, kwas hialuronowy jest naturalnym wielocukrem obecnym w tkankach łącznych, gdzie zapewnia odpowiednie wiązanie wody w obrębie tkanki. Jest on szeroko wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz medycynie (82,83). Był on również wykorzystywany jako nośnik leków, w tym również leków przeciwnowotworowych oraz białek (84–86).

1.1.4.3 Biopolimery białkowe

Białka to klasa naturalnych cząsteczek stanowiących podstawowy budulec organizmów żywych. Z uwagi na swoją amfifilowość stanowią dobry materiał do produkcji nośników leku – mogą oddziaływać zarówno z lekami hydrofobowymi oraz hydrofilowymi (87). Nośniki leków otrzymane z naturalnych białek są biodegradowalne, metabolizowane, i podatne na modyfikacje – posiadają wolne grupy karboksylowe, aminowe, fenolowe i imidazolowe dzięki którym można do nich dołączać leki bądź swoiste ligandy (88). Dotychczas, białkowe nośniki leku były wytwarzane z rozpuszczalnych białek naturalnych takich jak: albumina, żelatyna, i białka jedwabiu oraz nierozpuszczalnych białek jak zeina czy gliadyna, najczęściej w formie mikro- i nanosfer oraz kapsulek (19,89).

Albumina otrzymywana jest najczęściej z surowicy ludzkiej lub bydłowej. Będąc głównym białkiem surowicy, odpowiedzialnym za transport substancji odżywczych ma ona naturalną zdolność wiązania leków (90). Białko to jest stabilne w pH od 4 do 9 i w temperaturze do 60°C (91). Albumina znalazła szerokie zastosowanie w wytwarzaniu nanosfer oraz kapsulek do dostarczania leków. Nośniki te posiadają na swojej powierzchni grupy tiolowe, aminowe oraz karboksylowe, które mogą być użyte do modyfikacji ich powierzchni. Jedną z metod uwalniania leku z albuminowych nośników jest naturalny proces trawienia białka przez proteazy (92). Istnieją liczne doniesienia, iż albumina jest akumulowana w obrębie guzów, co może zwiększyć swoistość terapii nowotworów za pomocą tych cząstek (93). Nanocząstki albuminy (ok 130 nm) skoniugowane z paklitakselem zostały zarejestrowane przez FDA do terapii zaawansowanego stadium raka piersi jako preparat o nazwie Abraxane (94). Formulacja ta istotnie statystycznie poprawiła efekt terapeutyczny i zmniejszyła toksyczność paklitakselu w oddziaływaniu na

zdrowe tkanki, w porównaniu z wolnym lekiem (94–96). Ponadto, obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się więcej systemów dostarczania leku na bazie albuminy (97).

Kolejnym białkowym materiałem, który jest wykorzystywany do produkcji nośników leku jest żelatyna (98,99). Białko to otrzymywane jest dzięki kontrolowanej hydrolizie kolagenu w warunkach kwasowych - typ A lub zasadowych - typ B (100). Oba typy różnią się między sobą punktem izoelektrycznym, masą cząsteczkową, składem aminokwasowym oraz lepkością. Zaletami żelatyny są: niski koszt, możliwość sterylizacji, oraz niska antygenowość (101). Żelatyna może być stabilizowana poprzez sieciowanie np. glutaraldehydem, co wpływa na kinetykę uwalniania leku z żelatynowych nośników (98,102). Badania *in vivo* wykazały, iż żelatynowe nanosfery modyfikowane PEGiem i ładowane doksorubicyną wykazywały zwiększoną akumulację w obrębie guza, a uwolniony lek powodował większą skuteczność terapeutyczną niż wolna doksorubicyna (103).

Gliadyna to białko glutenu występujące w zbożach. Dzięki swoim właściwościom wykorzystywana jest do produkcji nanocząstek zdolnych do adhezji i przenikania przez błony śluzowe. Hydrofobowość tego białka została wykorzystana do inkorporacji hydrofobowych leków (104). Nanocząstki gliadyny zostały użyte jako nośnik cyklofosfamidu, o opóźnionym profilu uwalniania (105).

Na szczególną uwagę zasługują nośniki leków zbudowane z białek jedwabiu. Jedwab naturalny pozyskiwany jest z kokonów jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) (106). Fibroina jedwabiu to białko o wielkości ok. 2.3 MDa składające się z powtarzającej się sekwencji sześciu aminokwasów (Gly–Ala–Gly–Ala–Gly–Ser)_n (107). Białko to posiada regiony hydrofobowe tworzące β-kartki stabilizujące biopolimer oraz regiony hydrofilowe nadające mu elastyczność (108). Zaletą jedwabiu naturalnego jest jego dostępność i łatwość pozyskiwania przy zastosowaniu prostej metody ekstrakcji z kokonów jedwabników (106). Jedwab naturalny, charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością i brakiem immunogenności. Nie zmienia on swoich właściwości pod wpływem większości metod sterylizacji (109). Posiada zdolność wydajnej inkorporacji substancji aktywnych, oraz powolnego, kontrolowanego uwalniania. Co więcej, poprzez modyfikację procesu ekstrakcji jedwabiu można wpływać na wielkość jego masy cząsteczkowej, przez co kontrolować wydajność ładowania oraz szybkość uwalniania leku (109). Biopolimery z jedwabiu naturalnego w formie filmów (110), hydrożeli (111), powłok (112), kapsulek oraz mikro i nanosfer (107,109,113–116) były wykorzystywane

jako systemy dostarczania leków. Sferyczne nośniki leków z jedwabiu naturalnego wykorzystane jako nośnik leków przeciwnowotworowych zostały przedstawione w tabeli nr 1.2.

Tabela 1.2. Nośniki z jedwabiu naturalnego *B. mori* do dostarczania chemioterapeutyków Źródło: (117) (zmienione)

Nośnik leku	Metoda wytwarzania nośnika	Inkorporowany lek	Źródło
Nanosfery jedwabiu	Mieszanie z etanolemowym roztworem paklitakselu	Paklitaksel	(114)
Nanosfery jedwabiu	Mieszanie z etanolemowym roztworem paklitakselu, a następnie mrożenie	Paklitaksel	(118)
Nanocząstki jedwabiu	Desolwatacja acetonem	Doksorubicyna	(113)
Nanosfery z mieszaniny jedwabiu i albuminy	Desolwatacja acetonem i sieciowanie glutaraldehydem	Metotreksat	(115)
Nanosfery z mieszaniny jedwabiu i chitosanu	Metoda kapilarna	Kurkumina	(116)
Liposomy pokryte białkiem jedwabiu <i>B. mori</i>	Mrożenie i liofilizacja z liposomami ładowanymi emodyną, utwardzanie metanolem	Emodyna	(112,119)

Pomimo doskonałej biokompatybilności nośników wytwarzanych z naturalnych biopolimerów, systemy te posiadają wspólną wadę jaką jest ograniczona możliwość kontroli ich parametrów fizykochemicznych. Ich właściwości częściowo zależą od źródła pozyskiwania; mogą różnić się pomiędzy partiami w zależności od źródła pochodzenia (zmiennosc osobnicza), pory roku, a także procesu oczyszczania (21). Przykładowo, w przypadku chitosanu brak możliwości kontroli nad stopniem jego deacetylacji oraz regulacji masy cząsteczkowej znacznie ogranicza powtarzalność procesu oczyszczania tego materiału (69,120). W przypadku jedwabiu naturalnego, proces usuwania immunogennych serycyń może wprowadzać dodatkowe zmienne do jakości otrzymanego biomateriału.

1.1.4.4 Bioinżynierowane białka

Bioinżynierowane polimery białkowe używane do wytwarzania nośników leku są zazwyczaj wzorowane na naturalnych białkach tworzących polimery takie jak jedwab naturalny oraz pajęczycy, kolagen czy elastyna (121–123). Bioinżynierowane białka łączą w sobie zalety

syntetycznych polimerów – kontrolę nad składem i właściwościami materiału oraz naturalnych biomateriałów – biokompatybilność. Co więcej, metody inżynierii genetycznej pozwalają dokładniej kontrolować właściwości bioinżynierowanego nośnika niż pozwala na to chemiczna synteza polimerów (124). Biosynteza białka na matrycy sztucznych genów pozwala uzyskać pożądane właściwości nośnika takie jak swoistość lub zdolność wiązania określonego leku. W przeciwieństwie do nośników z syntetycznych polimerów, białka oferują możliwość wytwarzania stabilnych nośników na drodze precypitacji, która najczęściej odbywa się w nietoksycznych warunkach (125). Bioinżynierowane białka oparte na sekwencji aminokwasowej elastyny lub jedwabiu: ELPs (ang. *elastin-like proteins*), SLPs (ang. *silk-like proteins*) oraz SELPs (ang. *silk elastin-like protein*) stosowane były do wytwarzania nośników substancji przeciwnowotworowych. Białka te najczęściej występują w formie miceli lub sfer zbudowanych z kopolimerów domen hydrofilowych oraz hydrofobowych. Przykładowo, białka SELP wykorzystano do inkorporacji hydrofobowej formy doksorubicyny, metodą koprecypitacji. Powyższa formuacja wykazywała 1,8 razy większą skuteczność przeciwnowotworową *in vitro* niż wolna doksorubicyna (126).

1.2 Jedwab pajęczy

1.2.1 Właściwości jedwabiu pajęczego

Jedwab pajęczy jest produkowany przez około 34 tysiące różnych gatunków pająków (Arachnida) (127,128). Był on wykorzystywany przez człowieka już w starożytnej Grecji, gdzie używano sieci pajęczych do tamowania krwawiących ran. Australijscy Aborygeni używają nici olbrzymich tropikalnych pająków jako żyłek do łowienia małych ryb, natomiast plemiona zamieszkujące Nową Gwineę plotą z jedwabiu pajęczego sieci rybackie, nakrycia głowy oraz torby (129). Przemysł włókienniczy zainteresował się wykorzystaniem nici pajęczej już na początku XVIII wieku, jednakże pozyskiwanie pajęczej przędzy okazało się wysoce nieefektywne i nieopłacalne, w porównaniu z pozyskiwaniem jedwabiu od jedwabników (129).

Biomateriał ten wzbudził ogromne zainteresowanie badaczy dopiero w latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy okazało się, że właściwości mechaniczne pajęczych nici przewyższają właściwości syntetycznych materiałów wyprodukowanych przez człowieka (130). Nici pajęcza jest bowiem pięć razy wytrzymalsza od stali i niemal cztery razy wytrzymalsza niż Kevlar – jeden z najbardziej wytrzymałych materiałów syntetycznych używanych m. in. do produkcji kamizelek kuloodpornych (131,132). Porównanie właściwości fizycznych jedwabiu pajęczego z innymi – sztucznymi oraz naturalnymi materiałami przedstawiono w tabeli nr 1.3. Nici jedwabiu zbudowana jest z białek, co zapewnia jej znakomitą biokompatybilność oraz biodegradowalność. Prosty skład aminokwasowy białek jedwabiu, oparty głównie na alaninie i glicynie sprawia, że białko to jest dobrze tolerowane przez heterologiczny układ odpornościowy. Badania przeprowadzone *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, iż jedwab nie wywołuje reakcji immunologicznej (133).

Tabela 1.3. Właściwości mechaniczne nici pajęczych oraz innych sztucznych i naturalnych materiałów Źródło: (131,134) (zmienione)

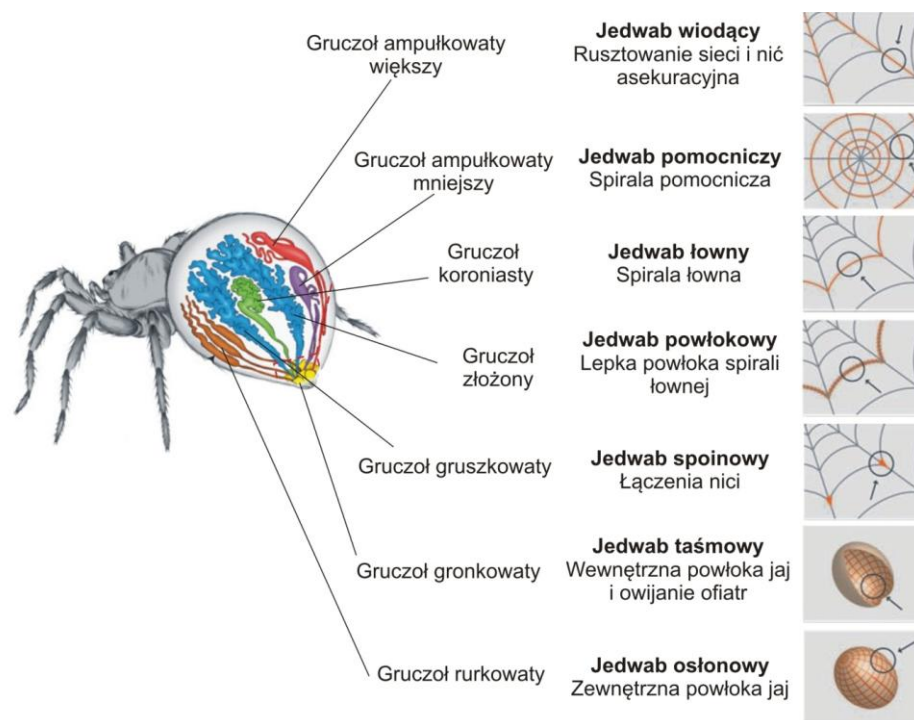
Material	Gęstość [g/cm ³]	Wytrzymałość [GPa]	Rozciągliwość [% długości]	Energia pęknięcia (wiązkość) [MJ/m ³]
Jedwab wiodący <i>A. diadematus</i>	1,3	1,1	27	180
Kevlar	1,4	3,6	2,7	50
Stal	7,8	1,5	0,8	6
Nylon	1,1	0,95	18	80
Włókno węglowe	1,8	4	1,3	25
Guma syntetyczna	2	0,05	850	100
Ścięgno (kolagen)	1,3	0,15	12	7,5
Kość	1,3	0,16	3	4
Wełna	1,3	0,2	50	60
Jedwab jedwabników <i>B. mori</i>	1,3	0,6	18	70

Dotychczas najlepiej poznane zostały jedwabie produkowane przez złotego pająka jedwabnego (*Nephila clavipes*) oraz europejskiego pająka ogrodowego popularnie zwanego krzyżakiem (*Araneus diadematus*) (135). Na ich przykładzie przedstawione zostaną rodzaje jedwabi pajęczych, proces przędzenia pajęczych nici oraz budowa białek jedwabiu. Badania nad strukturą włókien oraz procesem ich przędzenia stanowią podstawę działań mających na celu wytwarzanie biomateriałów o zbliżonych właściwościach mechanicznych opartych o bioinżynierowane jedwabie pajęcze.

1.2.2 Rodzaje jedwabi oraz ich rola

Znane są pająki produkujące do 7 rodzajów jedwabiu które różnią się strukturą i właściwościami, w zależności od pełnionej funkcji (ryc. 3) (135). Pająk *Araneus diadematus* buduje swoją sieć z pięciu rodzajów jedwabi. Rama i promienie pajęczyny powstają z nici wiodącej, która służy pająkowi również jako środek lokomocji i lina ratunkowa w razie ucieczki. Pomędzy promieniami sieci pająk przędzie nić pomocniczą, która służy mu jako rusztowanie do budowy właściwej spirali łownej. Po spełnieniu swojej funkcji nić pomocnicza jest zjadana przez pająka. Jedwab łowny buduje spiralę sieci, która następnie powlekana jest kolejnym rodzajem jedwabiu – kleistym jedwabiem powłokowym. Jedwab spoinowy łączy nici na ich skrzyżowaniach w obrębie pajęczyny oraz przytwierdza pajęczynę do podłoża. Dwa kolejne rodzaje jedwabi: osłonowy i taśmowy stanowią, odpowiednio zewnętrzną oraz wewnętrzną

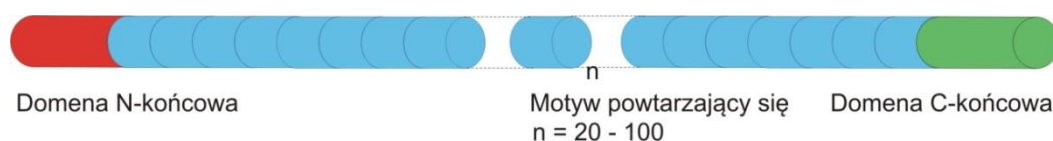
powłokę jaja pająka. Jedwab taśmowy służy dodatkowo do unieruchomienia i owinięcia w kokon ofiary pająka. Każdy z tych jedwabi produkowany jest w odrębnym gruczole przędnym, znajdującym się w odwłoku pająka (ryc. 4) (136,137).



Rycina 4. Rodzaje jedwabi pajęczych oraz produkujących je gruczołów na przykładzie pająka *A. diadematus*. Na podstawie: (127,135)

1.2.3 Struktura białek jedwabiu





Najlepiej poznanym z jedwabi pajęczych jest jedwab wiodący. Włókna tego jedwabiu zbudowane są z dwóch rodzajów białek, które od nazwy gruczołu który je wytwarza, zwane są głównymi spidroinami ampułkowatymi. W przypadku pająka *N. clavipes* są to białka MaSp1 i MaSp2 (ang. *Major Spidroin*), natomiast nić wiodąca pająka *A. diadematus* zbudowana jest z białek zwanych ADF3 i ADF4 (ang. *A. diadematus fibroin*) (138,139). Spidroiny to makromolekuły o masie cząsteczkowej od 200 do 350 kDa. Zbudowane są z rdzenia zawierającego powtarzające się sekwencje konsensusowe oraz niepowtarzających się domen na karboksylowym oraz aminowym końcu białka (ryc. 5) (140–142).



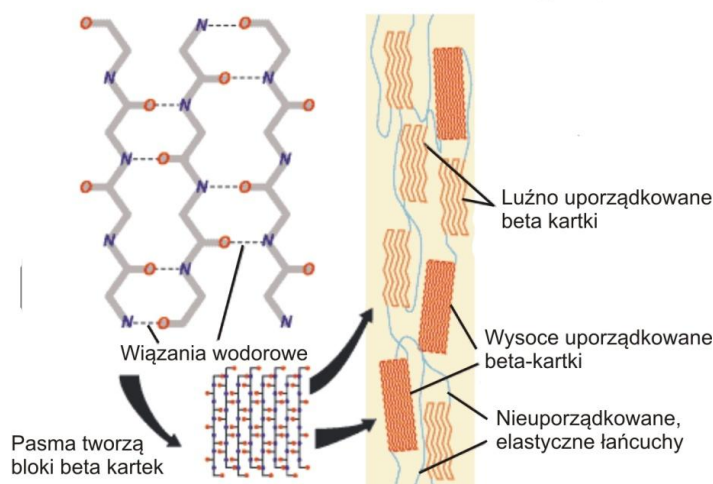
Rycina 5. Struktura białka jedwabiu pajęczego

Powtarzające się motywy rdzenia spidroin obu gatunków pająka zbudowane są głównie z glicyny (G) (ok. 42%) i alaniny (A) (ok. 25%). Pozostałe aminokwasy występujące w rdzeniu to glutamina (Q), seryna (S), leucyna (L), walina (V) prolina (P) i tyrozyna (Y) (143). Większość alanin występuje w ciągach liczących od pięciu do dziesięciu alanin, które tworzą strukturę β -kartki. Ponadto, spidroiny MaSp1 i ADF3 zawiera motywy GGX (gdzie X = Y, L lub Q), które układają się w elastyczną helisę- 3_{10} . Spidroiny MaSp2, ADF3 i ADF4 posiadają również motywy GPGXX (gdzie X = G, Q, L lub Y), które występując wielokrotnie w sekwencji tworzą elastyczną strukturę β -spiralii, a pojedynczo, strukturę β -zwrotu (136,142,144) (tabela 1.4.).

Tabela 1.4. Struktury drugorzędowe występujące w białkach jedwabiu wiodącego. Źródło: (144) (zmienione)

	Białko jedwabiu wiodącego	Motyw/struktura :			
		Poli A/GA  β -kartka	GGX  helisa 3_{10}	GPGXX  β -zwrot	N- i C-końce  α -helisa
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	+	+		+
	MaSp2	+		+	+
<i>Araneus diadematus</i>	ADF3	+	+	+	+
	ADF4	+		+	+

Kluczem do unikatowych właściwości włókien jedwabiu pajęczego jest struktura drugorzędowa oraz upakowanie białek jedwabiu budujących włókno. Sekwencja białek jedwabiu oparta jest głównie na najmniejszych aminokwasach. Brak dużych i posiadających ładunek łańcuchów bocznych umożliwia ciasne upakowanie łańcuchów i tworzenie fragmentów o strukturze krystalicznej (141,142). Ciągi alaninowe organizują się w strukturę antyrównoległej β -kartki, z których 40% występuje jako wysoko zorganizowane krystaliczne regiony stabilizowane przez wiązania wodorowe pomiędzy grupami bocznymi alanin. Struktury te są odpowiedzialne za mechaniczną wytrzymałość włókna jedwabiu. Motywy GGX oraz GPGGX tworzące spirale układają się pomiędzy regionami krystalicznymi. Odpowiadają one za rozciągliwość i elastyczność jedwabiu (145–147).

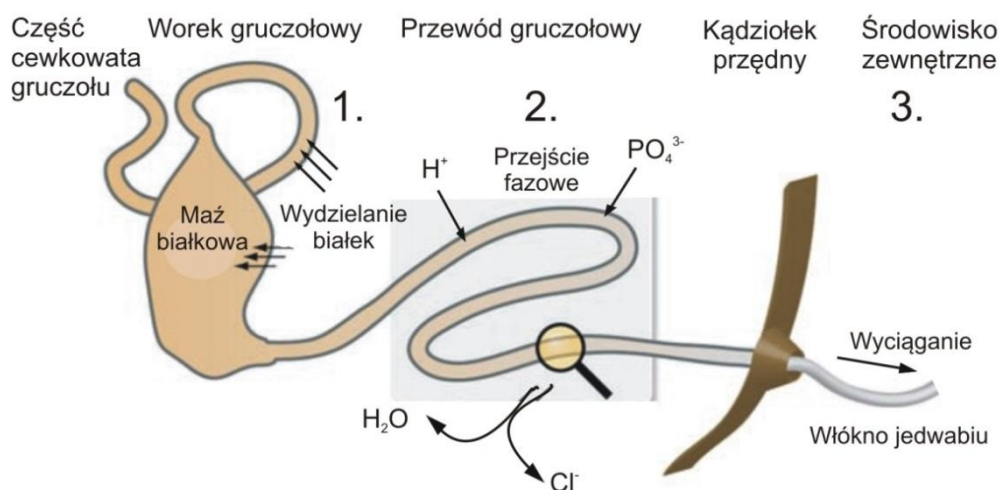


Rycina 6. Struktura włókna jedwabiu pajęczego. Źródło (148) (zmienione)

1.2.4 Proces przedzenia pajęczych nici

Rycina 7 przedstawia schemat budowy gruczołu przedniego pająka. Białka jedwabiu produkowane są z wysoką wydajnością przez wyspecjalizowane komórki wydzielnicze nabłonka, który wyściela część cewkową gruczołu. Rozpuszczalne białka wydzielane do światła gruczołu mają natywnie nieuporządkowaną strukturę drugorzędową bądź organizują się w poliprolinowe helisy typu II (ang. polyproline-II helix-like structures –PPII) (149). Białka te magazynowane są w worku gruczołowym w roztworze o bardzo wysokim stężeniu (nawet do 50%) (138,150). Pomimo bardzo wysokiego stężenia nie zachodzi precypitacja białek i jedwab utrzymywany jest w formie rozpuszczalnej (151). Rozpuszczalność jedwabiu na tym etapie jest związana z obecnością niepowtarzających się domen końcowych w cząsteczce białka. Domena N-końcowa jest wrażliwa na zmiany pH. W lekko zasadowym pH panującym w worku gruczołowym posiada konformację promującą stan rozpuszczalny białka (152,153). W drugim etapie procesu przedzenia, roztwór białka jedwabiu przechodzi przez przewód gruczołowy gdzie stopniowo zachodzi desorpcja wody, jonów sodowych oraz chlorkowych, a równocześnie wzrasta stężenie jonów fosforanowych oraz jonów wodorowych H^+ . Zmiany te są kluczowe dla ukształtowania się włókna jedwabiu, gdyż powodują one polimeryzację białek i ich przejście ze stanu ciekłego w stan stały. Zmiana stężenia jonów w świetle przewodu gruczołowego doprowadza do spadku pH z wartości 6,9 do 6,3 (151,154), co pociąga za sobą zmiany konformacyjne w N-końcowej domenie białek jedwabiu. Niepowtarzające się domeny końcowe białek jedwabiu są odpowiedzialne za odpowiednie ustawienie łańcuchów białkowych względem siebie białek. Domeny te, oddziałując ze sobą, zapobiegają przypadkowemu ułożeniu łańcuchów

białkowych i ustawiają ciągi alaninowe naprzeciwko siebie. Według jednej z teorii polimeryzacji białek jedwabiu, zmiany biochemiczne, a szczególnie desorpcja wody i wzrost stężenia jonów fosforanowych wywołują częściowe rozwinięcie łańcuchów białek. Białka te ustawiają się równoległe do kierunku przepływu wzdłużnego, a wraz ze wzrastającą siłą ścinającą indukowaną przez przepływ i zwężające się światło przewodu gruczołowego są ciasniej upakowywane. Bliskie odległości pomiędzy rozciągniętymi łańcuchami białek umożliwiają hydrofobowe oddziaływania pomiędzy ciągami alanin z sąsiednich łańcuchów. Alaniny te, wytwarzając międzycząsteczkowe wiązania wodorowe przechodzą w strukturę β -kartki i stabilizują białkowy polimer. Regiony β -kartek funkcjonują jako węzły stabilizujące elastyczne regiony włókna bogate w glicynę i prolinę (151,155,156). W kolejnym etapie, w następstwie przejścia fazowego ciec – ciało stałe, jedwab pajęczy w formie polimeru przesuwany jest ku ujściu przewodu gruczołowego, które znajduje się w kądziółkach przednich na końcu odwłoka pająka. Pająk wyciąga jedwabną nić używając czwartej pary odnóży. Po wydostaniu się włókna na zewnątrz, resztki cieczy, w którym rozpuszczone było białko jedwabiu odparowują, pozostawiając ostatecznie ukształtowane, dojrzałe włókno jedwabiu (157).

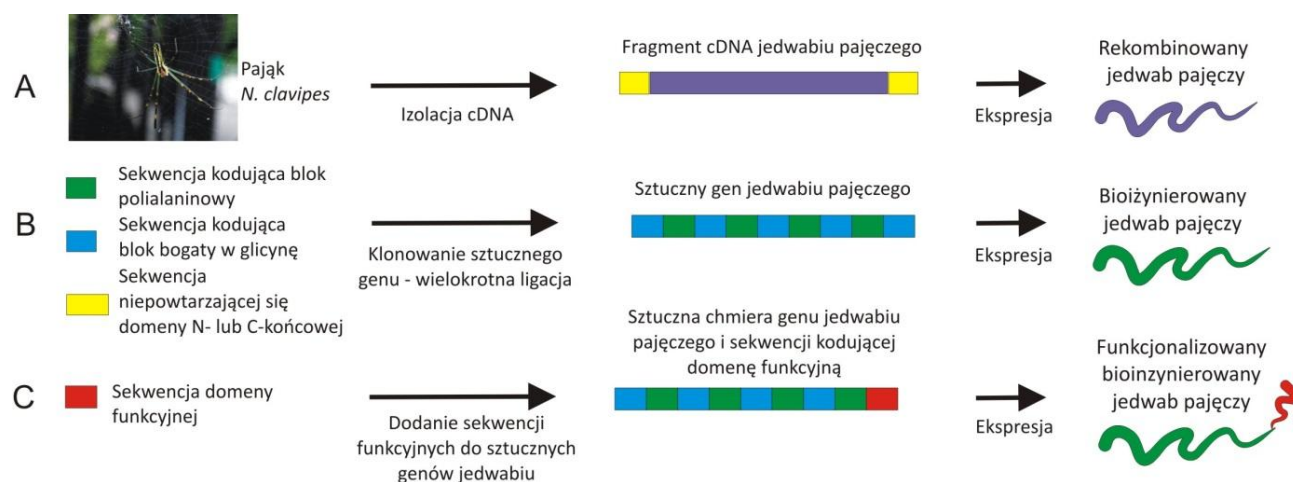


Rycina 7. Etapy przędzenia nici pajęczej zachodzące w gruczole przednim pająka, na przykładzie gruczołu ampułkowatego większego *A. diadematus*. 1) Sekrecja białek jedwabiu do światła gruczołu przedniego; 2) Polimeryzacja białek jedwabiu; 3) Ostateczne formowanie się włókna jedwabiu; Źródło: (134) (zmienione)

1.2.5 Biotechnologiczna produkcja białek jedwabiu pajęczego

W przeciwieństwie do ekstrakcji jedwabiu z kokonów jedwabników, pozyskiwanie jedwabiu pajęczego z naturalnego źródła jest bardzo trudne z kilku powodów: 1) gotowe sieci pajęcze zawierają różne rodzaje jedwabi, charakteryzujące się różnymi właściwościami, 2) hodowlę pajaków uniemożliwia ich terytorializm oraz kanibalizm, 3) koszt otrzymywania naturalnego jedwabiu jest wysoki, przy niskiej wydajności (158).

Rozwój biotechnologicznych technik nadekspresji białek w systemach heterologicznych oraz poznanie sekwencji genów kodujących jedwabie pajęcze otworzyły drogę do pozyskania tego unikatowego materiału bez udziału pajaków. Podjęte zostały liczne próby wyprodukowania jedwabi pajęczych w tradycyjnych systemach ekspresyjnych wykorzystujących bakterie pałeczki okrężnicy (*Escheirhia coli*) (159), drożdże *Pichia pastoris* (160), jak również komórki owadzie i ssacze (161,162), transgeniczne rośliny (163) oraz transgeniczne kozy (164). Zastosowano dwie strategie produkcji białek jedwabiu: w oparciu o fragmenty naturalnych cDNA kodujących spidroiny oraz w oparciu o sztuczne geny bazujące na sekwencjach jedwabi pajęczych (ryc. 8).



Rycina 8. Strategie otrzymywania rekombinowanego (A), bioinżynierowanego (B) oraz funkcjonalizowanego bioinżynierowanego (C) białka jedwabiu pajęczego.

1.2.5.1 Produkcja białek jedwabi pajęczych w oparciu o cDNA spidroin

Początkowo próbowano otrzymać rekombinowany jedwab pajęczy wykorzystując bakteryjny system ekspresyjny poprzez bezpośrednie wklonowanie cDNA spidroiny do wektora ekspresyjnego. Niestety, duży rozmiar (do 15000 kpz) oraz powtarzające się ciągi aminokwasów znacznie utrudniły ekspresję tego transgenu w gospodarzu bakteryjnym (141). Komórki wytwarzające spidroiny u pajaków posiadają zwiększoną pulę tRNA, które biorą udział w translacji sekwencji bogatych w alaninę i glicynę (głównych składowych białka jedwabiu). Bakterie natomiast nie posiadają zwiększonej ilości tRNA dla tych aminokwasów oraz mają inną niż eukarionty częstość występowania kodonów dla alaniny i glicyny, co razem, w znaczący sposób przyczyniło się do niepowodzeń tego systemu (141). Kolejną komplikacją okazała się rekombinacja homologiczna, która doprowadzała do usuwania powtórzeń. W konsekwencji, próby ekspresji fragmentu białka MaSp1 w systemie bakteryjnym dały niską wydajność oraz produkcję białka o skróconej sekwencji (141).

Przeprowadzono również próbę ekspresji białka jedwabiu w systemie eukariotycznym *P. pastoris*. W drożdżach udało się wyprodukować rekombinowany fragment białka jedwabiu o długości nawet do 1000 aminokwasów. Dodatkowym atutem systemu było wydzielanie przez drożdże transgenicznego białka do pożywki, jednakże białka te miały tendencje do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów (160).

Ze względu na filogenetyczne pokrewieństwo owadów i pajaków podjęto próbę produkcji rekombinowanego jedwabiu pajęczego w systemie bakulowirusowym. cDNA fragmentów spidroin ADF3 i ADF4 poddano ekspresji w owadzych komórkach Sf9. Ponadto, bakulowirusem transdukowano larwy jedwabnika (*Bombyx mori*), które jako naturalni producenci jedwabiu powinny poradzić sobie z ekspresją dużych genów kodujących spidroiny. Ekspresja z wykorzystaniem systemu bakulowirusowego napotkała jednak przeszkodę w postaci wytrącania się wyprodukowanych białek, spowodowaną prawdopodobnie różnicami w modyfikacjach postranslacyjnych (161).

Fragmenty białek jedwabi pajęczych udało się otrzymać również w transgenicznym liniach komórkowych (komórkach nabłonkowych bydłych gruczołów piersiowych (MAC-T) i komórkach nerkowych chomika (BHK) (162), w transgenicznym roślinach (tytoń i ziemniak (163,165) i gruczołach mlecznych transgenicznych kóz (164). Wspólną wadą tych systemów był niekorzystny stosunek wydajności do kosztów produkcji transgenicznych białek.

1.2.5.2 Produkcja bioinżynierowanych jedwabi pajęczych

Alternatywną metodą otrzymywania białek jedwabiu pajęczego jest ekspresja sztucznych genów otrzymanych z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej (154,166). Białka jedwabiu zbudowane są z powtarzających się sekwencji konsensusowych liczących ok. 30 aminokwasów (140). Sztuczne fragmenty DNA (oligonukleotydy) kodujące powtarzające się motywy (monomery), poddawane są hybrydyzacji, a następnie wielokrotnej ligacji do wektora ekspresyjnego. Powstały w ten sposób sztuczny gen jedwabiu pajęczego może składać się z kilku do kilkudziesięciu powtórzeń (154). Ponadto, częstość występowania poszczególnych kodonów, jest dostosowywana do bakteryjnej częstości kodonów systemu ekspresji genów, eliminując problem, który utrudniał ekspresję naturalnego cDNA. Najczęściej używanym systemem do produkcji białek jedwabi jest ekspresja w bakteriach *E. coli*, jednak istnieją również doniesienia o produkcji bioinżynierowanych jedwabi w transgenicznym roślina i zwierzętach (163,164). Na szczególną uwagę zasługuje produkcja jedwabiu opartego na sekwencji MaSp1 w nasionach *Arabidopsis thaliana*, gdzie bioinżynierowane białko stanowiło aż 18% białka całkowitego. Większość doniesień literaturowych o produkcji bioinżynierowanych białek pajęczych dotyczy białek wzorowanych na spidroinach jedwabiu wiodącego pajaków *N clavipes* (białka MaSp1 i MaSp2) oraz *A. diadematus* (białka ADF3 i ADF4) (167–170). Bioinżynierowane jedwabie oparte na motywach konsensusowych białek jedwabi przedstawiono w tabeli nr. 1.5.

Tabela 1.5. Sekwencje bioinżynierowanych jedwabii pajęczych i ich naturalne odpowiedniki. Źródło: (117) (zmienione)

Białko jedwabiu pajęczego	Bioinżynierowane białko	Sekwencja bioinżynierowanego białka jedwabiu	Źródło
MaSp1, <i>Nephila clavipes</i>	6x, 15x, MS1, 6mer, 15mer	(SGRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGT) <i>n</i>	(171–174)
MaSp1, <i>Nephila clavipes</i>	Block copolymers	MA(SQGGYGGLGSQGSGRGGLGGQTS) <i>x</i> (GAGAAAAAGGAGTS) <i>y</i>	(167,175)
ADF3, <i>Araneus diadematus</i>	eADF3, (AQ) <i>n</i>	(GPYGPASAAAAAAGGYGPGSGQQGPGQQGPG- QQGPGQQGPGQQ) <i>n</i>	(169,176)
ADF4, <i>Araneus diadematus</i>	eADF4, C16	(GSSAAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGP) <i>n</i>	(169,176– 180)
Flagelliform silk, <i>Nephila clavipes</i>	eFLAG	GPGGX)36(GGX)12GGTTIIEDLDITIDGADGPITISEELTI- (GPGGAGGPY)6(GPGGX)12	(181)
MaSp1, <i>Euprosthenops australis</i>	4Rep, 4RepCT	GGSGNSGIQQGGYGGLGQGGYGQAGSS(A)12GGQ- GGQGQGGYGQSGGS(A)15GRGQGGYGQSGGN(A)15- GQGGQGGYGRSQGAGS(A)15GSGQGGYGQGGQGGYQS	(182–184)

Bioinżynierowane białka jedwabiu często zawierają tylko sekwencje powtarzające się w rdzeniu naturalnej spidroiny. Dołączenie do nich domen występujących na N- i C-końcach białek jedwabiu, umożliwi badania nad wpływem N- i C-końcowych domen na rozpuszczalność, proces polimeryzacji oraz właściwości tych białek (169). Manipulacja liczbą powtórzeń stwarza z kolei możliwość oceny wpływu wielkości cząsteczki białka na proces tworzenia włókien oraz innych form strukturalnych (175).

1.2.5.3 Funkcjonalizacja bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego

Metody inżynierii genetycznej stanowią również narzędzie do funkcjonalizacji bioinżynierowanych białek. Funkcjonalizacja polega na dołączeniu do sekwencji DNA kodującej bioinżynierowany jedwab, DNA kodującego domenę funkcyjną tj. domenę spełniającą pożądaną funkcję: receptora, liganda, sekwencji sygnałowej czy wiążącej np. cząsteczki leku (117).

Najprostszą modyfikacją nadającą nowe funkcje bioinżynierowanym białkom jedwabiu jest wprowadzenie do ich sekwencji dodatkowych aminokwasów. Dodanie cysteiny posiadającej

grupy tiolowe w swoim łańcuchu bocznym daje możliwość chemicznej modyfikacji białek jedwabiu poprzez kowalencyjne przyłączanie peptydów, leków, barwników, enzymów lub cząsteczek biotyny (185). Inny przykład stanowi dołączenie polilizynowej domeny funkcyjnej do białka jedwabiu opartego na sekwencji MaSp1. Funkcjonalizacja ta umożliwiła elektrostatyczne wiązanie białek jedwabiu z cząsteczkami plazmidowego DNA (pDNA). Nanokompleksy z jedwabiu z cząsteczkami pDNA wykorzystano do transfekcji ludzkich embrionalnych komórek nerki (HEK) (186). Ten niewirusowy system dostarczania genów był następnie udoskonalany poprzez dodawanie kolejnych domen funkcyjnych zwiększających selektywność oraz skuteczność transfekcji. W celu zwieszenia skuteczności nanokompleksów, do sekwencji jedwabiu dodano sekwencję odpowiedzialną za ucieczkę kompleksu z endosomów (187), peptyd penetrujący bonę komórkową (TLM) oraz sekwencję kierującą do jądra (SV40) oraz sekwencję swoistą dla ludzkich komórek mezenchymalnych (hMSC) (188). Kolejnym przykładem funkcjonalizacji są domeny funkcyjne dodane do sekwencji jedwabiu w celu zwiększania adhezji, wzrostu oraz migracji komórek na powierzchni filmów oraz mat zbudowanych z funkcjonalizowanych bioinżynierowanych jedwabi pajęczych. W tym celu dołączano: motyw RGD (Arg-Gly-Asp) wiążący integryny (189,190), oraz peptydy IKVAV i YIGSR będące fragmentami laminy (191). Jansson i wsp. opisali strategię funkcjonalizacji bioinżynierowanego jedwabiu 4RepCT kilkoma domenami: fragmentem ABD wiążącym albuminę oraz domenami C i Z wiążącymi immunoglobuliny IgG (182). Funkcjonalizowany jedwab może również stanowić biomateriał do regeneracji tkanki kostnej. Dzięki domenom funkcyjnym takim jak: R5 – wiążącej krzemionkę, BSP – wiążącej wapń oraz CDMP1 – odpowiedzialną za nukleację i krystalizację hydroksyapatytu jedwabne rusztowania i filmy wspomagają wzrost komórek kościotwórczych i powstawanie struktur kostnych (192–194). Ponadto, 6-mer jedwabiu opartego na sekwencji MaSp1 funkcjonalizowano z przeciwbakteryjnymi peptydami: defensynami HNP-2 i HNP-4 (195). Bioinżynierowany jedwab pajęczy MS1 funkcjonalizowany domeną wiążącą receptor HER2 wykorzystano został jako budulec nanosfer – nośników leków stosowanych do terapii celowanej nowotworu piersi (173).

1.2.6 Oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego

Obok wydajnej produkcji bioinżynierowanych jedwabi pajęczych w systemach ekspresyjnych, niezwykle istotnym etapem pozyskiwania tego biomateriału jest proces oczyszczania białka. W najczęściej stosowanym systemie produkcji jedwabiu w bakteriach *E. coli*, białko jedwabiu jest wydzielane do cytoplazmy w formie rozpuszczalnej. Opracowane zostały trzy strategie izolacji tego białka. Należą do nich: chromatografia powinowactwa – metoda najczęściej stosowana (196–201), ekstrakcja termiczna (18, 20) i ekstrakcja kwasem organicznym (19, 20). Metoda oparta na chromatografii wymaga zastosowania domeny powinowactwa (tzw. tag). Domena ta, składająca się najczęściej z sześciu reszt histydynowych (His-tag) jest dołączana do sekwencji białka na poziomie DNA. Bioinżynierowane białko jedwabiu z domeną histydynową jest uwalniane z komórek bakterii poprzez lizę, a następnie wychwytywane na kolumnie chromatograficznej dzięki interakcji histydyn ze złożem zawierającym dwudodatnie jony metali takie jak Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} lub Ni^{2+} . Izolacja białka tą metodą może odbywać się w natywnych (196,199) lub denaturujących warunkach (197,201). Prostota, wydajność i niezawodność tej metody sprawia, że jest ona najchętniej stosowana w oczyszczaniu bioinżynierowanych białek. Zasadniczą wadą tej strategii jest natomiast konieczność modyfikacji sekwencji produkowanego białka poprzez dodanie histydyn. Obecność dodatkowej domeny może zaburzać właściwości białka takie jak jego ładunek, rozpuszczalność, składanie lub też być przyczyną cytotoksyczności i immunogenności bioinżynierowanego białka (174). Obawa ta jest uzasadniona w przypadku białek jedwabiu, gdyż wykazano, iż włókna wyprodukowane z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego posiadającego domenę His-tag były kruche i łamliwe, natomiast nici zbudowane z białek pozbawionych dodatkowej domeny wykazywały właściwości zbliżone do naturalnych nici pajęczych (204).

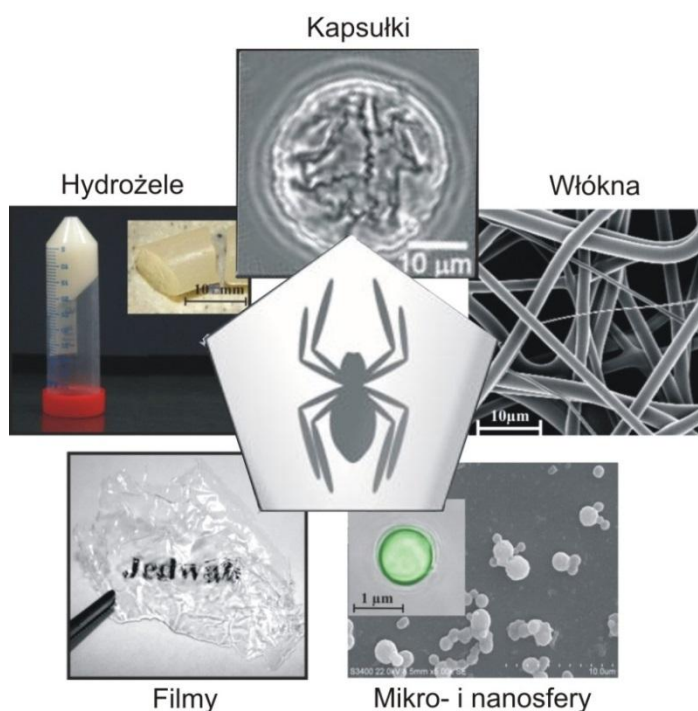
Dwie alternatywne metody oczyszczania jedwabiu bazują na naturalnych właściwościach jedwabiu – wytrzymałości termicznej oraz odporności na działanie kwasu organicznego. Właściwości tych nie posiadają białka bakteryjne. Po potraktowaniu kwasem propionowym lub wysoką temperaturą zostają one wytrącone z lizatu podczas gdy białka jedwabiu pajęczego pozostają w roztworze (203,205–207). Wytrącone białka bakteryjne są następnie oddzielane poprzez sedymentację. W metodzie ekstrakcji kwasem organicznym supernatant zawierający białko jedwabiu jest dializowany do odpowiedniego buforu, a następnie wymaga oczyszczenia z endotoksyn bakteryjnych na kolumnie anionowej (202). W przypadku izolacji termicznej, dalsze etapy obejmują wytrącenie białka jedwabiu z roztworu za pomocą siarczanu amonu oraz

ponowne jego rozpuszczenie w roztworze 6M tiocyjanianu guanidyny oraz dializę do odpowiedniego buforu (202,207). Ogromną zaletą obu metod jest brak konieczności stosowania domeny powinowactwa, a co za tym idzie wytwarzanie białka o sekwencji najbardziej zbliżonej do naturalnej.

1.2.7 Formy strukturalne biomateriałów z jedwabiu pajęczego i ich zastosowania

W wyniku ekspresji sztucznych genów jedwabiu oraz procesu oczyszczania otrzymywane są bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego w formie rozpuszczalnej. Analogicznie jak w przypadku naturalnych białek jedwabiu pajęczego przechowywanych w formie rozpuszczalnej wewnątrz worka gruczołowego pajaków, rozpuszczalne bioinżynierowane białka muszą zostać poddane procesowi przekształcania w odpowiednią formę morfologiczną (208). Intensywne badania prowadzące do poznania procesów zachodzących w gruczołach przednich pająka przyczyniły się do zrozumienia, a zatem możliwości odwzorowania procesu wytwarzania jedwabnych biomateriałów (154). Co więcej, w warunkach laboratoryjnych możliwa jest kontrola nad procesem polimeryzacji białek jedwabiu poprzez zastosowanie czynników takich jak: odczynniki chemiczne (sole, rozpuszczalniki organiczne, czynniki sieciujące), bodźce mechaniczne (siły ciągnące i ścinające) oraz innych – takich jak temperatura czy pH (176).

Stosując różne techniki, bioinżynierowane jedwabie pajęcze przetworzono w kilka form morfologicznych biomateriału takich jak: włókna, filmy, hydrożele, rusztowania, pręty, mikrokapsułki, oraz sfery (209) (ryc. 9).



Rycina 9. Formy strukturalne biomateriałów z bioinżynierowanych jedwabii pajączych. Źródło: (209) (zmienione)

1.2.7.1 Włókna

Włókna mogą być wytwarzane za pomocą: mokrego przędzenia, elektroprzędzenia wodnego roztworu jedwabiu lub jedwabiu rozpuszczonego w heksafluoroizopropanolu (HFIP) (154,210–212) oraz metody mikroprzepływowej (211). W wodnym rozpuszczalniku białka jedwabiu pajączego mogą podlegać procesowi samoskładania zbliżonego do tego przebiegającego w warunkach naturalnych. Warunki przepływu laminarnego podczas przędzenia zapewniają precyzyjną kontrolę nad stężeniem jonów, wartością pH, szybkością przepływu oraz działaniem sił ciągnących (176). Polimeryzacja włókien jest indukowana przez działanie metanolem, jonami fosforanowymi oraz mechanicznym wyciąganiem. Wyciąganie prowadzi do powstania dłuższych oraz cieńszych włókien o wyższej zawartości β -kartki i zwiększonej wytrzymałości (166). Badania wykazały, iż wielkość cząsteczek białka wpływa na jakość włókien. Bioinżynierowany analog MaSp1 złożony z 96 sekwencji konsensusowych formował prawidłowe, wytrzymałe włókna, natomiast 32- i 16-merowe białka tworzyły nieprawidłowe włókna o niewielkiej wytrzymałości (168). Niepowtarzające się domeny pomagają pozycjonować cząsteczki białek jedwabiu, co promuje tworzenie się struktur β -kartki i prawidłową polimeryzację białek, jednak ich nieobecność w bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajączego, nie wpływa na utratę zdolności tworzenia włókien (213,214).

1.2.7.2 Filmy

Jedwabne filmy – cienkie błony biopolimeru powstają wskutek całkowitego odparowania rozpuszczalnika z roztworu białka jedwabiu. Rozpuszczalnikiem może być zarówno HFIP jak i woda (215). Strukturę drugorzędową tak powstałych filmów stanowią konformacje helikalne oraz nieuporządkowane (216). Dla zwiększenia stabilności i mechanicznej wytrzymałości filmów, traktowane są one metanolem lub jonami fosforanowymi, co prowadzi do dalszego odwodnienia filmu, co z kolei indukuje tworzenie struktur β -karkki (217). W przeciwieństwie do nietraktowanych filmów, te poddane działaniu czynników odwadniających są nierozpuszczalne i stabilne w roztworach wodnych a także w silnych czynnikach denaturujących takich jak 8M mocznik czy 6M chlorek guanidyny. Jedwabne filmy doskonale nadają się jako podłoże do wzrostu komórek tkanki łącznej (191,218), a bioinżynierowane jedwabie poddane opisywanym wyżej funkcjonalizacjom domenami promującymi wzrost komórek kościotwórczych i wiązanie składników mineralnych kości stanowią biomateriał o ogromnym potencjale regeneracji tkanek kostnych (190,192,194,217,219).

1.2.7.3 Hydrożele

Jedwabne hydrożele powstają na skutek spontanicznej polimeryzacji białek jedwabiu, która zachodzi przy dużym zagęszczeniu białek w roztworze. Indukcja żelowana możliwa jest również w niskim pH oraz w obecności jonów Ca^{2+} (209). Białka jedwabiu tworzące hydrożel formują ciągłą sieć polimeru, w której uwięziona zostaje faza ciekła. Sieć ta może chłonać wodę, jednak pozostaje nierozpuszczalna w roztworach wodnych (209). Hydrożele charakteryzuje duża elastyczność oraz wysoka kruchość. Bioinżynierowany jedwab pajęczy – eADF4 przekształcono w hydrożel poprzez działanie na roztwór białka niskim stężeniem (<300 mM) fosforanu potasu (220). Bufor ten indukował spontaniczne formowanie się nanofibryl o średnicy ok. 3 nm i długości ok 1 μm . Następnie nanofibryle tworzyły niestabilną sieć, która poprzez zastosowanie chemicznych czynników sieciujących takich jak peroksydwusiarczan amonu (APS) ulegała stabilizacji. Uzyskany w ten sposób hydrożel utrzymywał swoją stabilność przez kilka tygodni (220,221).

1.2.7.4 Rusztowania

Podobnie jak w przypadku hydrożeli, produkcja rusztowań wymaga wysokich stężeń białka jedwabiu w roztworze (222). W celu otrzymania rusztowania, do roztworu dodaje się kryształki chlorku sodu lub glukozy, które nie rozpuszczają się w stężonym roztworze białka. Następnie rozpuszczalnik zostaje odparowany co powoduje polimeryzację jedwabiu. Kryształki substancji porogennej są następnie rozpuszczane w wodzie, w rezultacie czego otrzymywana jest porowata struktura rusztowania, o wielkości porów odpowiadającej średnicy kryształków soli lub glukozy (223). Stabilizacja tak powstałej struktury polega na wytwarzaniu struktur β -kardki w jedwabnym biopolimerze poprzez działanie metanolem, etanolem lub wysoką temperaturą (224). Biokompatybilne jedwabne rusztowania stanowią doskonale podłoże do przestrzennej hodowli komórek, a co za tym idzie posiadają ogromny potencjał w inżynierii tkankowej (166). Rusztowania zbudowane z naturalnego jedwabiu pajęczego, podobnie jak te z jedwabiu jedwabników stanowiły podłoże do wzrostu chondrocytów i tworzenia tkanki chrzęstnej (225).

1.2.7.5 Kapsułki

Amfifilowy charakter białek jedwabiu pajęczego powoduje spontaniczne organizowanie się białek na granicy faz takich jak substancja organiczna/woda lub olej/woda. Emulsyfikacja wodnego roztworu białka eADF4 toluenem prowadzi do formowania się kapsulek (ryc. 1) o mikrometrowej średnicy (1 – 30 μm) (226). Metoda ta może być wykorzystywana do enkapsulacji wielkocząsteczkowych substancji takich jak leki, enzymy czy hormony. Białkowa otoczka kapsułki posiada pory o średnim punkcie odcięcia 27 kDa, co umożliwia swobodną dyfuzję małych cząsteczek do wnętrza kapsułki (180,186,226). Jeśli w kapsułce zamknięte zostaną enzymy, uzyskane zostanie zamknięte środowisko reakcji – porowata otoczka kapsułki umożliwił będzie swobodną dyfuzję substratów oraz produktów reakcji, podczas gdy enzymy będą chronione przed proteolizą. Taki układ, uzyskany dotychczas przy użyciu modelowego enzymu β -galaktozydazy, ma ogromny potencjał do dostarczania substancji aktywnych (12).

1.2.7.6 Sfery

Jedwabne sfery wytwarzane były za pomocą różnych metod, najczęściej przez wysalanie jonami kosmotropowymi (227) oraz desolwatację (koacerwację) rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak metanol, etanol, aceton czy DMSO (113). Pierwsza metoda polega na wysalaniu białka jonami fosforanowymi (228). Powyżej krytycznego stężenia jonów fosforanowych (> 400 nM dla białka eADF4) indukuje się rozdzielenie faz białka i rozpuszczalnika. Następujący wzrost oddziaływań hydrofobowych między cząsteczkami białka powoduje zmianę konformacji łańcuchów białkowych i precypitację białka. Wzrost sfer postępuje dopóki stężenie rozpuszczalnego białka w fazie bogatej białka osiąga równowagę rozpuszczalności (228). Dla białka eADF4 proces formowania się sfer postępował w ciągu 120 sekund, a ich rozmiar zależał od stężenia białka w roztworze oraz szybkości mieszania (229). Powstałe w ten sposób sfery były stabilne w roztworach wodnych, a także wykazywały odporność chemiczną na czynniki denaturujące, porównywalną ze stabilnością chemiczną naturalnych nici pajęczych (230). Druga metoda polega na desolwatacji, inaczej ekstrakcji białka rozpuszczonego w wodnym buforze do roztworu antyrozpuszczalnika: etanolu, metanolu lub acetonu. Rozpuszczalnik i antyrozpuszczalnik stosowane w tym systemie muszą być zdolne do mieszania się ze sobą. Na skutek dodania antyrozpuszczalnika, cząsteczki białka zostają wyekstrahowane z fazy wodnej do fazy antyrozpuszczalnika. Wydzielają się dwie fazy: faza zawierająca koacerwat – białko jedwabiu w formie sfer oraz mieszaninę rozpuszczalnika (roztworu wodnego) z antyrozpuszczalnikiem (np. acetonem) (89,231). Proces koacerwacji przebiega najefektywniej w punkcie izoelektrycznym danego białka, wartość pH roztworu białka ma więc kluczowe znaczenie dla wydajności tego procesu (88). Sferyczne cząstki jedwabiu stanowią biomateriał o ogromnym potencjale jako biokompatybilne nośniki substancji aktywnych.

Potencjalne zastosowania poszczególnych struktur podsumowano w tabeli nr 1.6.

Tabela 1.6. Formy strukturalne biomateriałów z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych i ich potencjalne zastosowania. Źródło: (209) (zmienione)

Forma morfologiczna	Metoda wytwarzania	Potencjalne zastosowania	Źródło
Włókna	Mokre przędzenie Elektroprzędzenie	Tekstylija Nici chirurgiczne	(162,168,176)
Filmy	Mikroprzepływy Kontrolowane odparowanie rozpuszczalnika	Maty do hodowli komórek System opóźnionego uwalniania leków Matryce do wzrostu i różnicowania się komórek. Opatrunki Biosensory np. wykrywające poziom glukozy	(185,190–192,194,215,218)
Hydrożele	Żelowanie roztworu białek jedwabiu w niskim pH.	Kontrolowane uwalnianie leków Opatrunki Podłoże do hodowli osteoblastów, tkanki łącznej	(122,220,232,233)
Rusztowania	Dehydratacja żeli metanolem Dodatek porogenów (NaCl, glukoza) Porowanie gazem Liofilizacja	System opóźnionego uwalniania leków Trójwymiarowe rusztowanie do hodowli komórek, (wzrost tkanki kostnej, tkanki chrzęstnej, skóry właściwej i naskórka) Opatrunki	(223,225,234)
Mikrokapsulki	Powstawanie polimeru na powierzchni styku faz olej/woda	System dostarczania i kontrolowanego uwalniania wielkocząsteczkowych kosmetyków, substancji odżywczych, leków, odczynników, znaczników fluorescencyjnych	(180,226)
Mikro- i nanosfery	Mieszanie w obecności jonów fosforanowych, Koacerwacja rozpuszczalnikami organicznymi	System dostarczania i kontrolowanego uwalniania niskocząsteczkowych leków, kosmetyków, substancji odżywczych	(173,176,177,228)

1.3 Sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako nośniki leków.

W obliczu ograniczeń, jakie niosą za sobą nośniki leków wykonane z nanocząstek nieorganicznych, syntetycznych oraz naturalnych polimerów istnieje zapotrzebowanie na nanonośniki wykonane z biokompatybilnych materiałów, których właściwości mogą podlegać precyzyjnej kontroli. Bioinżynierowane białka jedwabi pajęczych są obiecującymi kandydatami na materiał do wytwarzania nośników substancji aktywnych. Posiadają one przewagę nad syntetycznymi i naturalnymi polimerami, iż proces ich wytwarzania w bakteriach *E. coli* może być ściśle kontrolowany, przez co powtarzalny. Ponadto, właściwości białka jedwabiu, mogą być modyfikowane poprzez manipulowanie sekwencją aminokwasową lub długością łańcucha białkowego (235,236). Powyższe modyfikacje mogą mieć więc znaczący wpływ na proces ładowania i uwalniania substancji aktywnych, co dodatkowo umożliwia jego kontrolowanie.

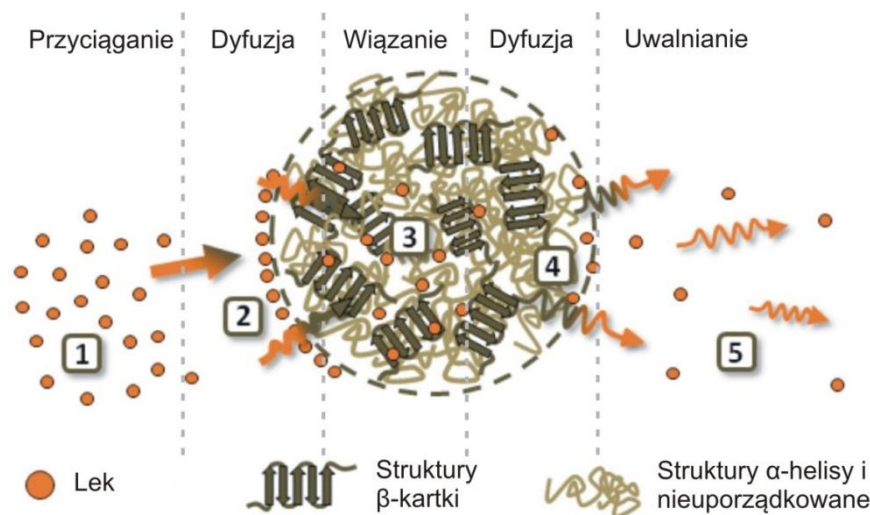
Dotychczasowe doniesienia o nośnikach leku opartych na bioinżynierowanych jedwabiach pajęczych dotyczą sfer oraz kapsułek zbudowanych z białka eADF4(C16) wzorowanego na sekwencji białka ADF4 pająka *A. diadematus* (237–242) oraz białek opartych na sekwencji białka MaSp1 pająka *N. clavipes*: białka MS1 oraz kopolimerów blokowych (ang. *block copolymers*) (197,207,243–246). Większość badań skupia się nad wykorzystaniem substancji modelowych, aby określić potencjał nośników z bioinżynierowanych jedwabi jako nośniki leków (246).

1.3.1 Sfery z bioinżynierowanego białka eADF4 (C16)

Białko eADF4(C16) składające się z szesnastu powtórzeń sekwencji GSSAAAAAAAAASGPGGYGPENQGSPGGYGPGGP zostało przekształcone w sferyczne cząstki za pomocą wysalania fosforanem potasu o stężeniu większym niż >400 mM (238). Drugie bioinżynierowane białko pajęcze – eADF3, powstałe w oparciu o inną spidroinę jedwabiu wiodącego *A. diadematus* tworzyło niestabilne sfery o nieregularnej, lepkiej powierzchni (247). Sfery z białka eADF4(C16) były stabilne w roztworze wodnym oraz nie ulegały zniszczeniu w roztworach czynników denaturujących takich jak 8M mocznik czy 6M chlorek guanidyny (237). Sfery wyprodukowane z tego białka nie ulegały zniszczeniu i nie zmieniały swoich właściwości po poddaniu procesowi wielokrotnej sterylizacji w 121°C oraz sterylizacji w 134°C (248).

Stężenie białka oraz szybkość mieszania białka eADF4(C16) z fosforanem potasu miały wpływ na wielkość otrzymanych sfer (241). Najmniejsze sfery, miały ok. 250 nm średnicy, gładką powierzchnię, posiadały ujemny ładunek powierzchniowy i były bogate w strukturę β -kardki (177,249). Potencjał sfer eADF4(C16) jako nośników niskocząsteczkowych substancji aktywnych zbadano poprzez inkorporację 12 modelowych substancji o różnych właściwościach chemicznych. Spośród tej grupy, największą wydajność ładowania wykazały związki naładowane dodatnio, co świadczyło o istotnej roli oddziaływań elektrostatycznych w procesie inkorporacji (177). Proponowane są różne mechanizmy wnikania leku do wnętrza sfer, w zależności od właściwości chemicznych leku oraz od metod jego inkorporacji. Jeden z nich, proponowany przez Lammela i wsp. (177) bazuje na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy cząsteczką modelową a białkiem jedwabiu (ryc.10). Cząsteczki substancji modelowych są przyciągane do powierzchni sfery, a następnie po wysyceniu powierzchni sfery, niskocząsteczkowe substancje wnikają do jej wnętrza. We wnętrzu cząsteczki wiążą się z biopolimerem przez oddziaływania hydrofobowe bądź elektrostatyczne. Uwalnianie tych

substancji z powierzchni zachodzi spontanicznie wraz z upływem czasu (250). Szybsze uwalnianie może być indukowane obniżeniem poziomu pH (113).



Rycina 10. Mechanizm ładowania i uwalniania leków wg. Lammela i wsp. (240). Źródło: (242) (zmienione)

Podjęte zostały również próby inkorporacji wielkocząsteczkowych substancji aktywnych takich jak lizozym. Podobnie jak w powyższym przykładzie, białko to zostało zainkorporowane przez jedwabne sfery dzięki elektrostatycznemu przyciąganiu ujemnie naładowanych sfer i dodatnich cząsteczek lizozymu (178). Aby umożliwić inkorporację leków o ujemnym ładunku, sekwencję białka eADF4(C16) zmodyfikowano poprzez zamianę kwasu glutaminowego na lizynę. Nowe białko eADF4(κ16) miało dodatni ładunek powierzchniowy i wykazywało zdolność inkorporacji ujemnie naładowanego modelowego leku – karboksyfluoresceiny oraz cząsteczek dwuniciowego DNA (251).

Testowano także różne metody ładowania substancji modelowych takie jak 1) ładowanie po wytworzeniu sfer, 2) ładowanie w trakcie wytwarzania sfer (koprecypitacja) oraz 3) ładowanie w obecności czynnika sieciującego. Koprecypitacja zwiększała wydajność ładowania leku, natomiast zastosowanie czynnika sieciującego opóźniało i wydłużało proces jego uwalniania ze sfer (179).

Substancje trudno rozpuszczalne w wodzie mogą być inkorporowane do wnętrza sfer dzięki oddziaływaniom hydrofobowym z hydrofobowym ciągiem polialaninowym występującym w białkach jedwabiu (114,126,230,252). Amfifilowe właściwości białka

eADF4(C16) pozwoliły na inkorporację modelowej substancji nierozpuszczalnej w wodzie – β -karotenu. Białka jedwabiu eADF4(C16) stabilizowały zawiesinę koloidalną β -karotenu poprzez jego enkapsulację w mikrometrycznych sferach, które samoistnie powstały w mieszaninie (230). Eksperyment ten pokazał, iż białko to ma zdolność enkapsulacji leków nierozpuszczalnych w wodzie, co jest bardzo istotne dla zwiększania dostępności biologicznej hydrofobowych leków, takich jak chemioterapeutyki.

1.3.2 Kopolimery (*Block copolymers*)

Grupa prof. Kaplana uzyskała białka będące kopolimerami dwóch fragmentów (bloków) opartych na sekwencji MaSp1 *N. clavipes* (167). Blok hydrofobowy, o sekwencji SGAGAAAAGGAGT odpowiada za tworzenie się struktury β -kartki i stabilność kopolimerów, natomiast hydrofilowy blok SQGGYGGLGSQSGRGLGGQT zapewnia polimerowi elastyczność. Powstało kilka wariantów kopolimerów różniących się długością, liczbą oraz stosunkiem bloków hydrofilowych do hydrofobowych. Zaobserwowano, iż wraz z ze wzrastającą długością bloków hydrofobowych, wzrastała zawartość β -kartki w otrzymanywanych strukturach morfologicznych. Wzrastająca liczba bloków hydrofobowych powodowała zmianę morfologii struktur tworzonych przez kopolimery – z filmów, poprzez cząstki o średnicy od 1 do 3 μm do dużych, złożonych micelli o średnicy 50 μm (167,244,245).

1.3.3 Sfery z białka MS1

Białko MS1 jest bioinżynierowanym jedwabiem pajęczym powstałym na bazie białka MaSp1 składającym się z piętnastu powtórzeń sekwencji SGRGLGGQGAGAAAAGGAGQGGYGGLGSQGT. W odróżnieniu od powyższych przykładów bioinżynierowanych jedwabi. białko to posiada jedynie sekwencję wzorowaną na jedwabiu pajęczym – jest ono pozbawione dodatkowej sekwencji umożliwiającej oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa (207). Białko to tworzyło submikrometryczne sfery w procesie wysalania fosforanem potasu (246). Sekwencję białka MS1 została zmodyfikowano poprzez dodanie domen funkcyjnych wiążących receptor Her2. Domeny te były krótkimi peptydami: H2.1 (MYWGDSHWLQYWYE) oraz H2.2 (LTVSPWY), które zapewniały białku MS1 oraz wytworzonym z niego sferom wiązanie i wnikanie do komórek nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją Her2. Ten swoisty nośnik leku załadowano doksorubicyną i wykazano skuteczne dostarczeniu leku do komórek nowotworowych *in vitro* (246).

Nośniki leków z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych zebrano w tabeli nr 1.7.

Tabela 1.7. Sferyczne nośniki leków z bioinżynierowanych jedwabii pajęczych.

Biomateriał	Średnia wielkość	Metoda wytwarzania	Substancja(e) modelowa (e)	Źródło
Nanosfery z białka eADF4(C16)	170 – 700 nm	Wysalanie fosforanem potasu	Chlorthalidon Nipagina Acetaminofen Czerwień fenolowa Tetrakaina Prokaina Papaweryna Efedryna Propranolol Biperydyna Mleczan etakrydyny Fiolet metylu	(177)
Nanosfery z białka eADF4(C16)	521 ± 8.3 nm	Wysalanie fosforanem potasu - mikromieszanie	lizozym	(178)
Nanosfery z białka eADF4(C16)	< 1 μm	Wysalanie fosforanem potasu, dodatek czynnika sieciującego	Rodamina B	(179)
Mikrosfery z białka eADF4(C16)	1 – 5 μm	Emulsyfikacja z β-karotenem	β-karotenem	(230)
Mikrosfery z białka eADF4(κ16)	1 – 2 μm	Wysalanie fosforanem potasu - dializa	dsDNA	(251)
Nanosfery MS1	400 nm	Wysalanie fosforanem potasu	dokсорubicyna	(161)

Podsumowując, biomateriał do konstrukcji nośnika leku oraz proces jego wytwarzania mają kluczowe znaczenie dla właściwości fizycznych, biokompatybilności, a także zdolności do inkorporacji i uwalniania leku.. Jedwab pajęczycy jest doskonale poznanym i scharakteryzowanym białkiem o prostym składzie aminokwasowym. Ten biokompatybilny i biodegradowalny materiał łączy zalety i eliminuje wady zarówno syntetycznych polimerów jak i biomateriałów naturalnego pochodzenia. Proces produkcji i oczyszczania bioinżynierowanych białek podlega ścisłej kontroli, co umożliwi otrzymane jak najbardziej jednorodnego produktu (253). Co więcej, skala produkcji białek jedwabiu, jak i produkcji sfer lub nanocząstek może być zwiększona do skali przemysłowej. Nośniki leków w postaci sfer z bioinżynierowanych jedwabii pajęczych posiadają ogromny potencjał do zastosowań w terapii wielu chorób, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych. System dostarczania leków oparty na nanosferach wykorzystujących efekt EPR bądź też ukierunkowanie na receptory występujące na komórkach nowotworowych umożliwia kumulację leku w obrębie guza oraz jego powolne uwalnianie. W

efekcie uzyskujemy poprawę indeksu terapeutycznego powszechnie stosowanych leków chemicznych.

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę opracowania biokompatybilnych nośników leku z bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego. Z białek tych otrzymano submikrometryczne sfery metodami wysalania fosforanem potasu oraz desolvatacji rozpuszczalnikami organicznymi. Badano wpływ metody oczyszczania białka, sekwencji aminokwasowej bioinżynierowanego jedwabiu, oraz warunków wytwarzania sfer na właściwości jedwabnych nośników oraz ich zdolność inkorporacji leków. Opracowanie optymalnych warunków wytwarzania jedwabnych sfer, dokładna charakterystyka ich właściwości fizycznych oraz zdolności inkorporacji leków są niezbędnym elementem oceny ich potencjału jako systemu dostarczania leków. Oprócz skuteczności nośnika, ważna jest również standaryzacja jego wytwarzania, precyzyjna kontrola oraz automatyzacja procesu, co jest niezbędne w perspektywie zastosowań klinicznych..

2. Założenia i cel pracy

Zastosowanie nośników leku przyczynia się do poprawy indeksu terapeutycznego, czasu działania i biodostępności terapeutyków, a także zmniejszenia ich działań niepożądanych. Nośniki powinny charakteryzować się zdolnością wiązania i uwalniania leku, być bezpieczne dla organizmu oraz ulegać degradacji i eliminacji po spełnieniu swojej roli. Bioinżynierowany jedwab pajęczy jest materiałem biokompatybilnym i biodegradowalnym, a proces jego wytwarzania jest w pełni kontrolowalny, zapewnia powtarzalność oraz nielimitowaną dostępność materiału. Opracowanie technologii wytwarzania nośników leku zbudowanych z bioinżynierowanych jedwabii pajęczych (sfer) ma duży potencjał aplikacyjny. Szczegółowa charakterystyka właściwości fizycznych jedwabnych sfer, optymalizacja procesu ich wytwarzania, oraz badanie inkorporacji i uwalniania leków są niezbędnymi elementami oceny przydatności bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako nośnika leków.

Głównym celem niniejszej pracy był rozwój innowacyjnych nośników leku opartych na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczego.

Cele szczegółowe obejmują:

1. Przygotowanie konstruktów genowych nowych bioinżynierowanych jedwabii pajęczych w oparciu o sekwencję konsensusową białka MaSp2 pajaka *N. clavipes*, wytwarzanie bioinżynierowanych białek w bakteriiach *E.coli* i ich oczyszczanie metodami denaturacji termicznej oraz ekstrakcji kwasowej
2. Analizę wpływu metody oczyszczania na właściwości rozpuszczalnych białek jedwabiu oraz formowanych z nich nośników (sfer).
3. Analizę wpływu sekwencji aminokwasowej białka na właściwości fizyczne bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego: MS1 i MS2.
4. Analizę ładowania oraz kinetyki uwalniania leków przeciwnowotworowych ze sfer MS1 i MS2
5. Przygotowanie do automatyzacji procesu wytwarzania sfer z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego MS2
6. Wytwarzanie sfer metodą desolvatacji rozpuszczalnikami organicznymi
7. Badanie biokompatybilności i immunogenności jedwabnych sfer.

3. Materiały i metody

3.1 Konstrukcja genów bioinżynierowanych jedwabi pajęczych

Wektor zawierający syntetyczny gen kodujący 15-mer białka MS1 – pETNX-MS1.15x otrzymano od prof. Davida L. Kaplana z Tufts University w Medford, w Stanach Zjednoczonych.

Sekwencję genu kodującego monomer białka MS2 projektowano w oparciu o sekwencję aminokwasową białka MaSp2 *Nephila clavipes*. Oligonukleotydy kodujące sekwencję konsensusową białka MaSp2, po hybrydyzacji wykorzystywano monomer sztucznego genu kodującego bioinżynierowane białko MS2. Sekwencje oligonukleotydów były następujące:

MS2F -
 CTAGCGGTCCAGGCGGCTATGGTCCGGGCCAGCAAGGGCCGAGCGGTCCGGGCTCG
 GCGGCCGCGGCTGCGGCAGCGGCCGGACCTGGCGGCTATGGTCCGGGCCAGCAGA
 i MS2R - CTAGTCTGCTGGCCCGGACCATAGCCGCCAGGTCCGGC-
 CGCTGCCGCAGCCGCGGCCCGCCGAGCCCGGACCGCTCGGCCCTTGCTGGCCCGGAC
 CATAGCCGCCTGGACCG (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgia). Otrzymany po hybrydyzacji dwuniciowy fragment DNA (monomer) posiadał lepkie końce komplementarne do końców generowanych przez restryktazy *NheI* i *SpeI*.

Wektor pGEMTeasy wytrawiano enzymami *NheI* i *SpeI* po czym poddawano defosforylacji. Następnie wektor pGEMTeasy rozdzielono w 0,7% żelu agarozowym po czym wycinano fragment żelu zawierający DNA wektora, który następnie izolowano przy użyciu zestawu do izolacji DNA z żelu (A&A Biotechnology). W następnym etapie przygotowany wektor ligowano z monomerem MS2. Równocześnie przeprowadzano kontrolę procesu defosforylacji wektora – inkubowano wektor w obecności ligazy i odpowiedniego buforu (bez monomeru).

W kolejnym etapie transformowano bakterie kompetentne *E. coli* szczepu DH5α (Invitrogen) mieszaniną ligacyjną oraz kontrolną. Transformowane bakterie wysiewano na płytkę z medium stałym LB zawierającą antybiotyk selekcyjny – penicylinę. Następnie, pobierano losowo wybrane kolonie bakteryjne z płytki po transformacji mieszaniną ligacyjną, namnażano w hodowli płynnej, po czym izolowano plazmidowe DNA. Obecność wstawek w plazmidzie sprawdzano za pomocą trawienia enzymami *SphI* i *NdeI*, natomiast prawidłowość

orientacji wstawki sprawdzano poprzez trawienie enzymami *NheI* i *NcoI*. Otrzymany plazmid z wklonowanym monomerem - pGEM TeasyNX-MS2.1x przecięto restryktazą *NheI*, defosforylowano i ponownie ligowano z monomerem, jak opisano powyżej. Plazmid z wklonowanym dimerem - pGEM TeasyNX-MS2.2x wytrawiano restryktazą *NheI*, defosforylowano i ligowano z kolejnym monomerem w celu otrzymania plazmidu pGEM TeasyNX-MS2.3x. Następnie, sekwencję trimeru MS2.3x wytrawiano za pomocą restryktaz *NheI* i *SpeI*, rozdzielano w żelu agarozowym i izolowano. Plazmid pGEM TeasyNX-MS2.3x wytrawiano enzymem *NheI*, defosforylowano i ligowano z trimerem MS2.3x. Po ligacji otrzymano plazmidy pGEM TeasyNX-MS2.6x oraz pGEM TeasyNX-MS2.9x. Fragmenty 6- oraz 9-meru następnie wytrawiano i ligowano ze sobą, stosując technikę opisaną powyżej, w celu otrzymania ostatecznego konstruktów pGEM TeasyNX-MS2.15x zawierającego 15-mer sekwencji MS2.

Konstrukty kodujące białka MS2 o długości 9- oraz 15-meru klonowano następnie do wektorów ekspresyjnych pETNX. W tym celu, fragmenty te wytrawiano za pomocą restryktaz *NdeI* i *XhoI*, rozdzielano na żelu agarozowym oraz izolowano z żelu. Wektor ekspresyjny pETNX wytrawiano enzymami *NdeI* i *XhoI*. Fragmenty kodujące sekwencje 9- oraz 15-meru ligowano z przygotowanym wektorem, w celu otrzymania plazmidów pETNX-MS2.9x oraz pETNX-MS2.15x. Bakterie transformowane tymi wektorami namnażano w pożywkach zawierających antybiotyk selekcyjny kanamycynę. Poprawność klonowania sprawdzano za pomocą trawienia enzymami *NdeI* i *XhoI*, natomiast prawidłowość orientacji wstawki sprawdzano poprzez trawienie enzymami *NheI* i *SpeI*. Po weryfikacji plazmidy transformowano do ekspresyjnego szczepu bakterii *E.coli*: BLR (DE3) (Novagen).

Sekwencje prawidłowych konstruktów, po każdym etapie klonowania sprawdzano poprzez trawienie odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi, jak opisano powyżej, oraz sekwencjonowaniem DNA w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Bakterie zawierające prawidłowe konstrukty, na każdym etapie klonowania, zamrażano w medium glicerolowym w -80°C . Odczynniki pochodziły głównie z firmy Fermentas, chyba że zaznaczono inaczej.

3.2 Ekspresja białek jedwabiu pajęczego

Bakterie *E. coli* BLR (DE3) zawierające odpowiedni konstrukt (pETNX-MS1.15x, pETNX-MS2.15x lub pETNX-MS2.9x) posiewano selekcyjnie na płytkę ze stałym medium LB zawierającym kanamycynę (50 µg/ml), a następnie przenoszono pojedyncze kolonie do pożywki płynnej LB zawierającej kanamycynę oraz tetracyklinę o stężeniu po 50 µg/ml. Całoczną hodowlą bakterii inokulowano pożywkę płynną po czym kontynuowano hodowlę przez 16 godz. Tak przygotowana hodowla stanowiła inokulum hodowli bioreaktorowej. Bioreaktor Bioflo 3000 lub Bioflo 415 (New Brunswick Scientific) zawierający płynną pożywkę (tabela 3.1) przygotowywano przed zaszczepieniem hodowli poprzez sterylizację, polaryzację oraz kalibrację elektrody DO oraz kalibrację elektrody pH.

Tabela 3.1. Skład pożywki bakteryjnej w hodowli bioreaktorowej oraz medium dokarmiającego.

Składnik pożywki	Stężenie w pożywce	Producent
Ekstrakt drożdżowy	20 g/l	A&A Biotechnology
Glukoza	10 g/l	POCH
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g/l	Sigma
Kwas cytrynowy	0,85 g/l	Sigma
KH ₂ PO ₄	6,7 g/l	Sigma
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g/l	Sigma
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g/l	Sigma
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01125 g/l	Sigma
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 µg/l	Sigma
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,5 µg/l	Sigma
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	1,15 µg/l	Sigma
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 µg/l	Sigma
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5 µg/l	Sigma
Kanamycyna	50 µg/ml	A&A Biotechnology
Składnik pożywki dokarmiającej	Stężenie medium	Producent
Ekstrakt drożdżowy	500g/l	A&A Biotechnology
Glukoza	100g/l	POCH
20% MgSO ₄ x 7H ₂ O	2%	Sigma
Kanamycyna	50 µg/ml	A&A Biotechnology

Odczyn pH pożywki kontrolowano poprzez automatyczne dozowanie wody amoniakalnej (POCH) oraz pożywki dokarmiającej w składzie wymienionym w tabeli 3.1 i utrzymywano na poziomie 6,82. Natlenowanie pożywki kontrolowano poprzez regulację przepływu sprężonego powietrza i utrzymywano na poziomie 40%. Temperatura utrzymywana była na poziomie 37°C.

Hodowlę w powyższych warunkach prowadzono aż do osiągnięcia gęstości optycznej zawiesiny bakterii w pożywce $OD_{600} = 10$. Po osiągnięciu tej wartości dodawano induktor operonu laktozowego IPTG (izopropyl-1- β -D-galaktopiranozyd) (A&A Biotechnology) o ostatecznym stężeniu $1\mu\text{M}$. Następnie hodowlę prowadzono przez 4 godziny, po czym zbierano bakterie poprzez wirowanie przez 10 min $5\,000g$. Osad bakteryjny przechowywano w temperaturze -80°C .

3.3 Oczyszczanie białek jedwabiu

3.3.1 Metoda termiczna

Osad bakteryjny (20g) inkubowano przez 30 min. w buforze do lizy zawierającym: 20 mM HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid), 100 mM NaCl, pH 7,5, koktajl inhibitorów proteaz SIGMAFAST oraz $200\mu\text{g/ml}$ lizozymu (Thermo Fisher Scientific). Następnie lizat mrożono w -80°C przez 24h, po czym rozmrażano i poddawano sonikacji i działaniu DNAzy w stężeniu $100\mu\text{g/ml}$ przez 1 godzinę w obecności jonów Mg^{2+} . Następnie białka bakteryjne wytrącano z lizatu za pomocą denaturacji termicznej w temperaturze 80°C przez 10min, po czym oddzielano je poprzez wirowanie przy $50\,000g$ przez 30 min. Następnie denaturację w 80°C prowadzono przez kolejne 20 min, po czym próby ponownie wirowano. Supernatant zbierano i filtrowano przez filtr $0,2\mu\text{m}$. Białka jedwabiu pajęczego wytrącano z supernatantu przy użyciu 20% siarczanu amonu. Po całonocnej inkubacji, białka zostały oddzielone za pomocą wirowania przy $7\,000g$ przez 20 min., a następnie rozpuszczone w 6M tiocyjanianie guanidyny. Rozpuszczone białka dializowano do buforu 10mM Tris-HCl, pH 7,5 używając membrany dializacyjnej z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia = 12 – 14 kDa (Carl Roth).

3.3.2 Metoda ekstrakcji kwasowej

Osad bakteryjny zawieszano w 3.3 M kwasie propionowym w ilości 1ml kwasu na każdy 1 g osadu, a następnie zawiesinę rozcieńczano ultraczystą wodą 5,78-krotnie i inkubowano przez godzinę z ciągłym mieszaniem. Wytrącone białka bakteryjne usuwano za pomocą sedymentacji poprzez wirowanie przy $50\,000g$ przez 30 minut. Następnie supernatant filtrowano przez filtr $0,2\mu\text{m}$ i dializowano do buforu 10mM Tris-HCl, pH 7,5 używając membrany dializacyjnej z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia 12 – 14 kDa (Carl Roth). Roztwór białka następnie oczyszczano na kolumnie ze złożem jonowo-wymiennym Q-sepharose (GE Healthcare Life Sciences), według wytycznych producenta.

Niezależnie od zastosowanej metody oczyszczania (termicznej bądź kwasowej) białka zagęszczano poprzez ultrafiltrację przy użyciu filtrów Amicon (Millipore) o punkcie odcięcia = 10 kDa. Następnie stężenie białka określano metodą spektrofotometryczną, co opisano w sekcji 3.13. Jakość otrzymanego białka oceniano za pomocą elektroforezy w 12.5% żelu SDS-PAGE z następującym barwieniem odczynnikiem Roti-Blue (Carl Roth). Masę cząsteczkowa białek potwierdzano spektroskopią MALDI-TOF wykonaną w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Poznaniu. Odczynniki pochodziły z firmy Sigma, chyba że zaznaczono inaczej.

3.4 Wytwarzanie sfer

Sfery z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych uzyskiwano poprzez wysalanie białka jedwabiu fosforanem lub poprzez desolwatację roztworu białka jedwabiu w rozpuszczalniku organicznym. Roztwory mieszano za pomocą pipety lub przy użyciu wysokociśnieniowych pomp strzykawkowych.

3.4.1 Wytwarzanie sfer za pomocą pipety

Roztwór białka jedwabiu w buforze Tris-HCl pH 7,5 o odpowiednim stężeniu (0,5 – 10mg/ml) mieszano z fosforanem potasu (K_3PO_4 , K_2HPO_4 lub KH_2PO_4) o różnych stężeniach (0,5 – 2M) oraz o różnym pH (4 – 10). Roztwory mieszano przy użyciu pipety z końcówką o pojemności 1000 μ l w stosunku objętościowym 1:10. Sfery wytwarzane z białka MS1 inkubowano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin, natomiast sfery wytwarzane z białek MS2 inkubowano 2 godziny. W metodzie wytwarzania sfer przez desolwatację, roztwór białka o stężeniu 2,5 mg/ml mieszano z czystym rozpuszczalnikiem organicznym (acetonem, metanolem, etanolem lub izopropanolem), a następnie inkubowano przez 16 godzin.

3.4.2 Wytwarzanie za pomocą pomp strzykawkowych

W celu wytwarzania sfer metodą mikromieszania, używano wysokociśnieniowych pomp strzykawkowych NeMESYS (Cetoni). Wysokociśnieniową strzykawkę ze stali nierdzewnej o pojemności 10 ml napełniano roztworem białka jedwabiu MS2 w 10mM Tris-HCl pH 7,5 o odpowiednim stężeniu w zakresie 0,1 – 2 mg/ml. Wysokociśnieniową strzykawkę ze stali nierdzewnej o pojemności 100ml napełniano 2M roztworem fosforanu potasu pH 8. Ze strzykawek wyprowadzono wężyki wykonane z materiału PEEK (Upchurch Scientific)

o średnicy wewnętrznej 0,5 lub 0,25 mm, i łączono trójnikiem z materiału PEEK (Upchurch Scientific) o średnicy wewnętrznej odpowiednio, 0,5 lub 0,25 mm. Z trójnika wyprowadzano wężyk o średnicy 2 razy większej niż wężyki doprowadzające, odpowiednio 0,5 i 1 mm (Upchurch Scientific). Roztwór białka mieszano z fosforanem w stosunku 1:1 lub 1:10. Dozowanie roztworów ze strzykawkę kontrolowano za pomocą oprogramowania neMESYS UserInterface (Cetoni). Wytworzone sfery zbierano do probówki 50 ml i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.

3.5 Oczyszczanie sfer

Aby uzyskać wodną zawiesinę sfer stosowano dializę lub ultrafiltrację, natomiast sfery wytwarzane w rozpuszczalnikach organicznych poddawano sedymentacji poprzez wirowanie 10 000g przez 10 min, a następnie usuwanie supernatantu z osadu sfer i zawieszenie ich w wodzie. Dializę sfer przeprowadzano stosując membranę dializacyjną z regenerowanej celulozy o punkcie odcięcia = 12 - 14 kDa. Sfery dializowano do wody destylowanej przez 24 godziny, kilkakrotnie wymieniając wodę. Po zakończonym procesie dializy sfery zbierano poprzez wirowanie 10 000g przez 10 min i zawieszano we wodzie.

Filtrację przeprowadzano przy użyciu kasyety ultra-filtracyjnej Pellicon XL 50 (Millipore) o punkcie odcięcia membrany filtracyjnej 100 kDa. Przepływ filtratu przez kasetę regulowano za pomocą pompy perystaltycznej. Po zakończonej filtracji wnętrze kasyety płukano, w celu odzyskania sfer zatrzymanych na membranie. Sfery następnie zagęszczano poprzez wirowanie 10 000g przez 10 min i zawieszano w ultra-czystej wodzie.

W innym wariantcie ultrafiltracji używano membrany filtracyjnej o średnicy 90mm i wielkości porów 0,025 μ m umieszczonej w dysku filtracyjnym (TAMI Industries). Przepływ filtratu regulowano za pomocą pompy perystaltycznej. Zamknięty system utrzymywano pod ciśnieniem 2 bar stosując sprężone powietrze. Sfery odpłukiwano z membrany filtracyjnej oraz odzyskiwano z filtratu poprzez wirowanie 10 000g przez 10 min. Ilość sfer określano grawimetrycznie po liofilizacji sfer zawieszonych w ultra-czystej wodzie.

3.6 Metody mikroskopowe

3.6.1 Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)

10 μ l zawiesiny sfer w ultra-czystej wodzie nanoszono na szkiełko nakrywkowe (Nunc) i suszono w temperaturze pokojowej. Próbkę pokrywano cienką warstwą platyny oraz palladu używając napylarki Quorum Sputter Coater Q150T ES (Quorum Technologies). Preparaty

obrazowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją pola JEOL JSM-7001F (Jeol). Stosowano napięcie przyspieszające wiązkę elektronów 5 – 10 kV oraz odległość roboczą (WD) od działła elektronowego 10 mm. Na uzyskanych mikrofotografiach przeprowadzano analizę wielkości sfer korzystając z oprogramowania ImageJ 1.46. Średni rozmiar sfer w próbce obliczano na podstawie średniej z trzech eksperymentów, z których każdy polegał na pomiarze co najmniej 100 sfer łącznie na 3 mikrofotografiach SEM.

3.6.2 FIB (ang. *Focused Ion Beam*)

Wodną zawiesinę sfer jedwabiu (10 μ l) suszono na powierzchni plastra silikonowego lub szkiełka nakrywkowego a następnie pokrywano cienką warstwą (ok. 10 nm) platyny z palladem przy użyciu napyłarki plazmowej 208HR, (Cressington Scientific Instruments Inc.). Próbkę obrazowano przy użyciu mikroskopu z systemem podwójnej wiązki FIB-SEM Zeiss NVision 40 (Carl Zeiss SMT). Do trawienia pojedynczych sfer używano zogniskowanej wiązki jonów galu Ga^+ o energii 30 keV. Próbkę obrazowano w sposób ciągły przed, podczas i po wytrawianiu wiązką jonów przy użyciu obrazującej wiązki elektronów o napięciu przyspieszającym 2 kV.

3.6.3 Konfokalna mikroskopia skaningowa

Wodną zawiesinę (50 μ l) jedwabnych sfer naładowanych doksorubicyną umieszczano na płytce hodowlanej (MatTek) i obserwowano pod skaningowym mikroskopem konfokalnym Leica TCS-SP2 (Leica). Fluorescencję doksorubicyny obserwowano przy użyciu lasera argonowego o długości fali wzbudzenia 488 nm oraz wodnego obiektywu immersyjnego o powiększeniu 63x. Obserwowano emisję fluorescencji doksorubicyny o długości fali 590nm. Rodaminę B obrazowano przy długości fali wzbudzenia/emisji 554/628.

Zawiesinę sfer ładowanych mitoksantronem obserwowano za pomocą konfokalnego mikroskopu skaningowego Leica TCS SP5 X (Leica) przy użyciu olejowego obiektywu immersyjnego o powiększeniu 100x. Do wzbudzenia fluorescencji mitoksantronu używano białego lasera o długości fali wzbudzenia 608 nm. Obserwowano emisję fluorescencji mitoksantronu o długości fali 684 nm. Pomiar kontrolowano za pomocą oprogramowania LAS AF, natomiast obróbki obrazu dokonywano w programie Leica LAS AF Lite (Leica).

3.7 Pomiar potencjału dzeta

Pomiary potencjału dzeta przeprowadzano przy użyciu instrumentu Dzetasizer Nano XS (Malvern Instruments). Przed pomiarem próbki poddawano sonikacji w łaźni wodnej przez 5 minut. 750 μ l wodnej zawiesiny umieszczano w kapilarnej kuwecie pomiarowej (Malvern).

Każdorazowo dokonywano trzech następujących po sobie pomiarów w temperaturze 25°C zgodnie z protokołem pomiarowym. Używano współczynników refrakcji dla wodnego rozpuszczalnika: 1,33 oraz dla 1,6 dla cząstek białkowych.

3.8 Dynamiczne rozpraszanie światła

Pomiar dynamicznego rozpraszania światła przez wodną zawiesinę jedwabnych sfer o stężeniu <0,1 mg/ml przeprowadzano przy użyciu aparatu Dzetasizer Nano XS (Malvern Instruments) w jednorazowej kuwecie UV. Pomiar przeprowadzano w temperaturze 25°C. Użyto współczynników refrakcji dla wodnego rozpuszczalnika: 1,33 oraz dla 1,6 dla cząstek białkowych.

3.9 Analiza rozmiaru sfer metodą śledzenia nanocząstek (ang. *Nanoparticle tracking*)

Sfery MS1 i MS2 formowane poprzez desolwatację acetonem analizowano za pomocą Nanosight LM10 (Nanosight) wyposażonego w laser 405 nm. Pomiarów dokonywano w wodnej zawiesinie sfer o stężeniu 10 µg/ml. Wodną zawiesinę sfer wprowadzano do komory pomiarowej, po czym inicjalizowano rejestrowanie obrazu cząstek przy pomocy kamery CCD. Moc lasera dopasowywano do intensywności sygnału próby. Każdorazowo rejestrowano 60 sekund nagrania, które poddawano analizie w programie NTA 2.3. Próg detekcji indywidualnych nanocząstek ustawiano na 10 klatek.

3.10 Spektroskopia FTIR

3.10.1 Pomiar rozpuszczalnego białka

50 µl roztworu białka jedwabiu o stężeniu 5 mg/ml w 10mM buforze Tris-HCl pH 7,5 nanoszono na trójodbiciową przystawkę (z kryształem selenku cynku) po uprzednim zwirowaniu przez 15 min 10 000 g. Jako tło pomiarowe stosowano bufor 10mM Tris-HCl pH 7,5. Pomiaru widma absorpcji dokonywano przy użyciu spektroskopu Bruker TENSOR 27 (Bruker) wyposażonego w detektor MCT. Widma rejestrowano w zakresie liczb falowych 4000 – 400 cm⁻¹ w 512 skanach, o rozdzielczości 2 cm⁻¹.

3.10.2 Pomiar wodnej zawiesiny sfer

10 μl wodnej zawiesiny sfer nakładano na kryształ fluorku wapnia i zostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Czynność powtarzano kilkakrotnie w celu akumulacji sfer na kryształach. Widma absorpcyjne sfer uzyskiwano za pomocą spektrometru Bruker Equinox 55/S (Bruker) z poziomą przystawką odbiciową MIRacle ATR z diamentowym kryształem. Jako tło pomiarowe używano czystego kryształu CaF_2 . Każdorazowo rejestrowano 128 skanów o rozdzielczości 2 cm^{-1} w zakresie liczb falowych od 4000 do 600cm^{-1} .

3.10.3 Pomiar liofilizowanych sfer w tabletkach KBr

Liofilizat zawierający $0,5 - 1\text{ mg}$ sfer mieszano w moździerzu z 200 mg bromku potasu. Pastylki wytwarzano za pomocą prasowania uzyskanego proszku pod ciśnieniem 15 ton/cm^2 . Uzyskane pastylki o średnicy 16 mm analizowano w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrometru Bruker TENSOR 27 (Bruker). Jako tło pomiarowe stosowano tabletkę z czystego KBr. Widma absorpcji rejestrowano jako średnią 512 skanów w zakresie liczb falowych $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ o rozdzielczości 2 cm^{-1} .

3.10.4 Analiza danych

Wstępną analizę widm przeprowadzano przy użyciu programu Opus 6.5 (Bruker). Dokonywano korekty linii bazowej widm. W zakresie falowym odpowiadającym regionowi amidu I ($1590 - 1710\text{ cm}^{-1}$) generowano drugą pochodną widma. Widmo poddawano rozkładowi na poszczególne komponenty w oparciu o procedurę autodekonwolucji fourierowskiej FSD (ang. *Fourier Self-deconvolution*) używając lorenzowskiego kształtu pasm, szerokości połówkowej $11 - 25\text{ cm}^{-1}$ oraz współczynnika redukcji szumów od $0,45$ do $0,3$. Pasma składowe dopasowywano przy użyciu programu PeakFit (SigmaPlot). Liczbę i pozycję pasm wyznaczano posługując się wartościami minimów drugiej pochodnej widma. Struktury drugorzędowe wchodzące w skład białka przypisywano poszczególnym pasmom składowym występującym w obrębie pasma amidu I zgodnie z danymi źródłowymi (254). Przyporządkowanie struktur odpowiadającym im zakresom liczb falowych przedstawiono w tabeli 3.2. Procentową zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych normalizowano względem absorpcji całego pasma amidu I.

Tabela 3.2. Pasma absorpcji wchodzące w skład amidu I i odpowiadające im struktury drugorzędowe białek.

Zakres absorpcji (cm^{-1})	Struktura drugorzędowa
1605 – 1615	łańcuchy boczne tyrozyn
1616 – 1637	β -kartki
1638 – 1655	struktura nieuporządkowana
1665 – 1662	helisy
1663 – 1696	β -zwroty i pętle
1697 – 1705	β -kartki

3.11 Spektroskopia Ramana

Pomiary i analizę danych spektroskopii Ramana prowadzono we współpracy z prof. Mirosławem Szybowiczem z Wydziału Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej. Widma jedwabnych sfer pozyskiwano przy użyciu spektrometru inVia Renishaw micro-Raman (Renishaw) połączonego z mikroskopem optycznym (Leica). Widma rejestrowano w zakresie liczb falowych $1550\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, który odpowiada zakresowi występowania absorpcji amidu I. Do dekonwolucji i analizy spektrum używano oprogramowania WIRE 3.1 (Renishaw).

3.12 Dichroizm kołowy

Widma dichroizmu kołowego uzyskiwano dla rozpuszczalnego białka MS2(9x). Roztwór białka w stężeniu $0,125\text{--}1\text{ mg/ml}$ w buforze $10\text{mM Tris-HCl pH } 7,5$ analizowano przy użyciu spektropolarymetru Jasco J-815 (Jasco) w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej $0,05\text{ mm}$ (Hellma Analytics). Widma uzyskiwano na drodze akumulacji dziesięciu skanów w zakresie długości fal od $300\text{ do }185\text{ nm}$, z szerokością pasma $0,5\text{ nm}$ i szybkością skanowania 50 nm/min . Tło pomiarowe ($10\text{mM Tris-HCl pH } 7,5$) odejmowano od uzyskiwanych widm dichroizmu kołowego białek. Widma wygładzano używając filtra wielomianowego Savitzkiego-Golaya w programie Spectra Analysis (Jasco Inc). Strukturę drugorzędową badanych białek szacowano przy użyciu bazy danych DICHROWEB (255). stosowano algorytm CDSSTR i zbiór danych referencyjnych nr 6 w zakresie długości fal od $185\text{ do }240\text{ nm}$.

3.13 Pomiary spektrofotometryczne stężenia białka oraz leku

Stężenie białek jedwabiu oznaczano metodą spektroskopii przy długości fali absorpcji światła UV 280 nm, przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) z zastosowaniem parametrów przedstawionych w tabeli 3.3: współczynnika ekstynkcji oraz masy cząsteczkowej białek.

Tabela 3.3. Parametry do oznaczania stężenia poszczególnych białek.

Białko	Masa cząsteczkowa [Da]	Współczynnik ekstynkcji [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]
MS1.15x	39543.1	22350
MS2.15x	46720.6	44700
MS2.9x	28155.3	26820

Pomiary spektrofotometryczne wykonywano również w celu oznaczenia ilości leków inkorporowanych oraz uwolnionych ze sfer. Pomiarów dokonywano za pomocą spektrofotometru Ultrospec 2000 UV-Vis (Pharmacia Biotech) przy długościach fali odpowiednio dla: rodaminę B - 535 nm; doksorubicyny – 509 nm; mitoksantronu - 610 nm; etopozytu – 230 nm.

3.14 Ładowanie leków do jedwabnych nośników

Rodaminę B (Sigma-Aldrich) oraz chemioterapeutyki doksorubicynę (Medac), mitoksantron (Oncotron) oraz etopozyd (Ebewe) inkorporowano do sfer MS1 oraz MS2 dwoma metodami: ładowaniem w trakcie wytwarzania sfer (PRE) oraz ładowaniem po wytworzeniu sfer (POST).

3.14.1 Ładowanie w trakcie wytwarzania sfer (PRE)

Do 1 mg roztworu białka jedwabiu (200 μl białka jedwabiu o stężeniu 5 mg/ml) dodawano 100 μg chemioterapeutyku (100 μl o stężeniu 1 mg/ml), a następnie mieszano z 1000 μl 2 M K_3PO_4 , pH 8. Po całkowitej inkubacji w temp. pokojowej sfery wirowano przez 10 min. przy 10000 g. Supernatant zbierano i mierzono jego absorbancję przy odpowiedniej długości fali, wg. punktu 3.12. Próbkę referencyjną przygotowywano poprzez mieszanie 300 μl buforu 10 mM Tris-HCl pH 7,5 z 1000 μl 2 M K_3PO_4 , pH 8. Ilość leku znajdującego się w supernatancie obliczano z wykorzystaniem krzywej standardowej rozcieńczeń danego chemioterapeutyku w buforze referencyjnym.

3.14.2 Ładowanie po wytworzeniu sfer (POST)

Inkorporacja leków do jedwabnych sfer przebiegała podczas całonocnej inkubacji zawiesiny zawierającej 1mg sfer w oraz 100 µg leku w końcowej objętości 300 µl PBS pH 7,4. Zawiesinę sfer z lekiem inkubowano w temperaturze pokojowej z ciągłym wytrząsaniem przy 100 RPM. Następnie, sfery wirowano (10 min. 10 000 g). Ilość leku znajdującego się w supernatancie określano za pomocą pomiaru spektrofotometrycznego posługując się krzywą wzorcową dla odpowiedniego leku przygotowaną w buforze PBS pH 7,4, jak opisano w sekcji 3.12. Ilość leku inkorporowanego do jedwabnych sfer obliczano jako różnicę pomiędzy ilością leku przed i po inkubacji ze sferami.

Wydajność ładowania leku do jedwabnych sfer obliczano za pomocą równania:

$$\text{Wydajność ładowania} = \frac{\text{ilość leku w sferach po inkorporacji} [\mu\text{g}]}{\text{ilość leku podanego przed inkorporacją} [\mu\text{g}]} \times 100\%$$

3.15 Uwalnianie leków

Sfery ładowane lekiem zawieszano w 1ml buforu PBS o odpowiednim pH (7,4; 6 lub 4,5) i inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°C z ciągłym wytrząsaniem. Następnie, próbę wirowano przez 10 min. przy 10 000 g. Supernatant zbierano, a sfery zawieszano w 1 ml świeżego buforu o odpowiednim pH. Stężenie leku w supernatancie określano poprzez pomiar spektrofotometryczny zgodnie z punktem 3.12. Pomiarów dokonywano w określonych punktach czasowych. Obliczano sumaryczną ilość uwolnionego leku względem czasu uwalniania.

3.16 Hodowla komórkowa

Mysie linie komórkowe: linię makrofagów J77 oraz linię fibroblastów 3T3 hodowano na szalkach Petriego o średnicy 10 cm (Sarstedt) w temperaturze 37°C w atmosferze wzbogaconej do 5% CO₂, o 100% wilgotności. Komórki hodowano w DMEM z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (Sigma Aldrich) oraz antybiotyku gentamycyny (KRKA) w stężeniu 80 µg/ml. Po osiągnięciu przez hodowlę komórek ok 90% konfluencji, przeprowadzano pasaż poprzez enzymatyczne oddzielenie komórek od podłoża za pomocą 10% trypsyny (Gibco). W celu zabezpieczenia rezerwy komórek danej linii, komórki bankowano poprzez mrożenie w medium do mrożenia przygotowywanym na bazie FBS z 10% dimetylosulfotlenkiem (DMSO). Zamrożony bank komórek przechowywano w ciekłym azocie.

3.17 Test żywotności komórek MTT

Test żywotności komórek w obecności jedwabnych sfer przeprowadzano na mysich fibroblastach 3T3. Komórki wysiewano na płaskodenne płytki 96-dołkowe (Nunc) w ilości 25 000 komórek/dołek. Po 24 godzinach hodowli do medium hodowlanego dodawano jedwabne sfery w stężeniach od 100 do 3,125 $\mu\text{g/ml}$ w medium hodowlanym. Sfery inkubowano w hodowli komórek przez 48 godzin. Następnie wykonywano test MTT zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Dokonywano odczytu kolorymetrycznej reakcji redukcji MTT do niebieskiego formazanu poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm. Używano czytnika mikroplatek Victor X3 (Perkin Elmer). Żywotność komórek wyrażano jako % redukcji MTT przez komórki według równania: próbka badana/ kontrola negatywna \times 100%. Eksperyment wykonywano trzy razy w pięciu powtórzeniach.

3.18 Test aktywacji makrofagów

Aktywację makrofagów przez jedwabne sfery mierzono za pomocą pomiaru ilości czynnika martwicy nowotworów (TNF α) wydzielanego do pożywki przez makrofagi linii J77. Makrofagi posiewano na płytki 96-dołkowe (Nunc) w ilości 100 000 komórek na dołek. Po 24 godzinach hodowli do medium dodawano jedwabne sfery w stężeniach od 100 do 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Sfery inkubowano z komórkami w hodowli przez 5 godzin. Następnie płytki hodowlane wirowano 10 min. 1 400 \times g, po czym zbierano po 80 μl medium hodowlanego z nad komórek, przenoszono na świeżą płytkę i przechowywano w -80°C . Ilość TNF α oznaczano za pomocą testu ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Pomiaru absorbancji prób dokonywano przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika mikroplatek Victor X3 (Perkin Elmer). Ilość TNF α w badanych próbach określano na podstawie odczytu z krzywej wzorcowej rozcieńczeń standardu TNF α . Eksperyment wykonywano trzy razy w trzech powtórzeniach.

3.19 Analiza statystyczna

Analizę istotności statystycznej uzyskanych wyników przeprowadzano za pomocą programu GraphPad v.5.0. Do określania istotności statystycznej różnic pomiędzy rodzajami sfer stosowano test t-studenta. Do określania różnic w uwalnianiu leku pomiędzy poszczególnymi grupami sfer stosowano dwustronny test wariancji (two-way ANOVA) z testem uzupełniającym Bonferroni post-hoc. Poziom istotności statystycznej przyjmowano jako: (*) przy $p < 0,05$; (**) jeśli $p < 0,01$ lub (***) jeśli $p < 0,001$.

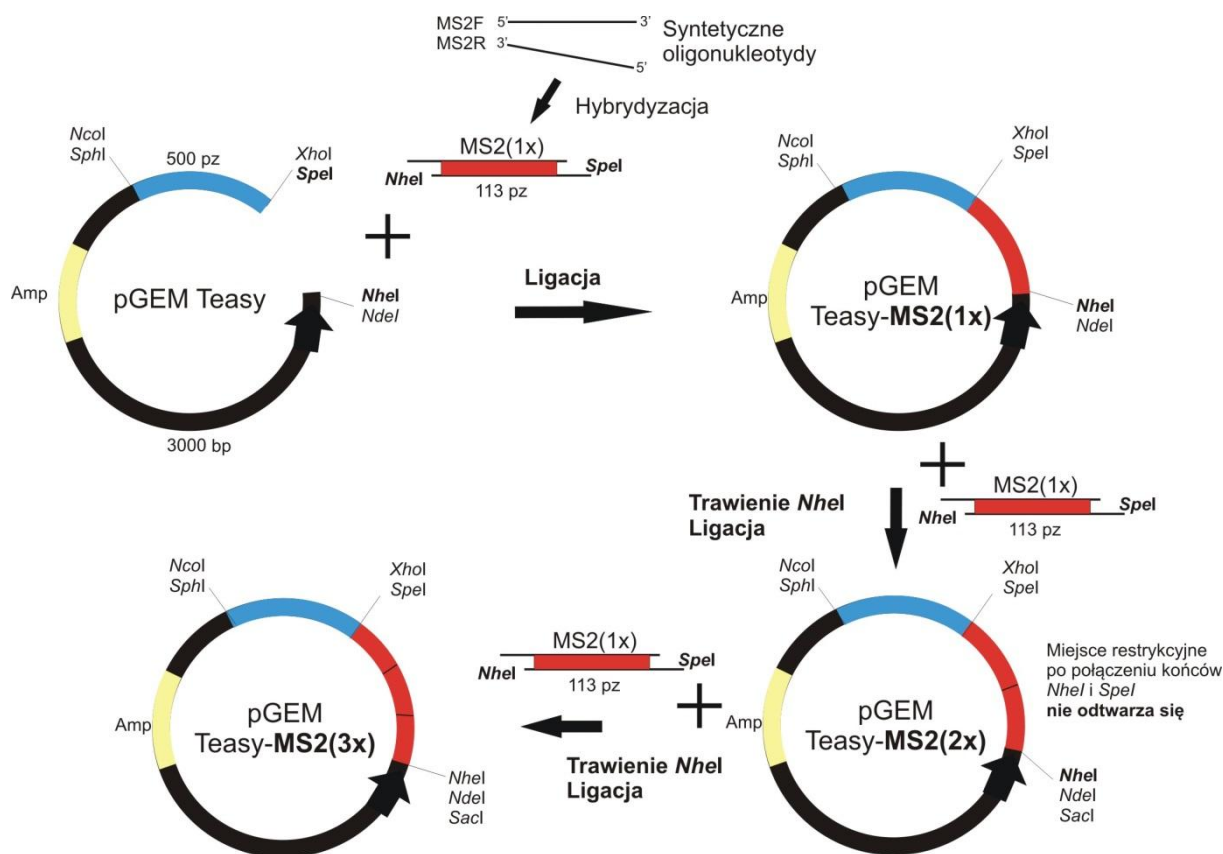
4. Wyniki

W niniejszej pracy podjęto badania nad praktycznymi aspektami wytwarzania nośników leku (sfer) z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych. Pierwszy z nich dotyczył wpływu metody oczyszczania na właściwości bioinżynierowanego białka jedwabiu pajęczego oraz wytworzonych z niego sfer. Drugi dotyczył wpływu sekwencji aminokwasowej białka na właściwości nośnika. Przeprowadzono badania nad sferami z bioinżynierowanych jedwabi o różnych sekwencjach aminokwasowych, w których analizowano ich właściwości oraz zdolność inkorporacji i uwalniania chemioterapeutyków. Kolejnym aspektem były próby minimalizacji wielkości otrzymywanych nośników oraz automatyzacji procesu ich wytwarzania. Natomiast w ostatniej części niniejszej rozprawy przedstawiono wyniki badań nad cytotoksycznością i immunogennością sfer z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych.

4.1 Konstrukcja wektorów ekspresyjnych pETNX-MS2

Sekwencję kodującą monomer bioinżynierowanego białka MS2 zaprojektowano w oparciu o sekwencję konsensusową białka MaSp2 pająka *Nephila clavipes*. Konstrukcja sztucznego genu kodującego bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego MS2 polegała na multimeryzacji syntetycznego nukleotydu MS2, zwanego dalej monomerem w celu otrzymania sekwencji składającej się z 6, 9 oraz 15 powtórzeń. Multimeryzację przeprowadzono przy użyciu techniki wielokrotnej ligacji. Wielokrotna ligacja była możliwa dzięki zastosowaniu restryktaz *NheI* i *SpeI* generujących komplementarne do siebie lepkie końce. Końce generowane przez enzymy *NheI* i *SpeI* po ligacji nie odtwarzały miejsca restrykcyjnego, co generowało trwałe połączenie zligowanych fragmentów DNA. Rozpoznawanie miejsc cięcia przez restryktazy było możliwe jedynie po połączeniu się końców *NheI/NheI* lub *SpeI/SpeI*. System taki zapewniał kontrolę łączenia poszczególnych monomerów, kontrolę nad orientacją nowo przyłączonych monomerów oraz umożliwiał ich multimeryzację.

W pierwszym etapie klonowania fragment kodujący monomer MS2 uzyskano poprzez hybrydyzację syntetycznych oligonukleotydów, który następnie wklonowano do wektora pGEM Teasy w miejsca restrykcyjne *NheI* i *SpeI* (ryc. 11).

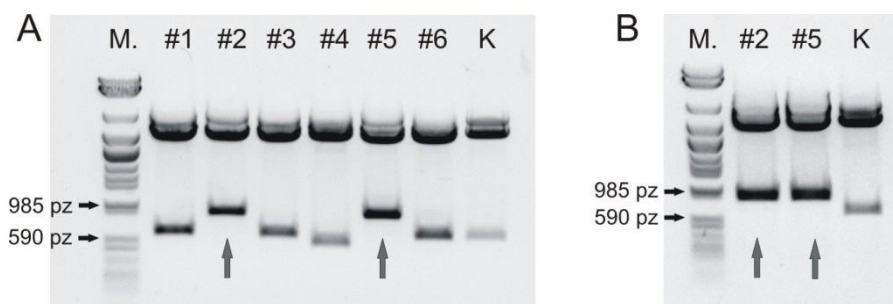


Rycina 11. Schemat pierwszego, drugiego i trzeciego etapu konstrukcji sztucznego genu kodującego białko MS2.

Plazmid zawierający monomer przecięto enzymem *NheI* i ligowano z kolejnym monomerem otrzymując dimer sekwencji MS2. Następnie czynności te powtórzono, otrzymując plazmid pGEM Teasy-MS2(3x). Poprawność ligacji sprawdzono na każdym etapie poprzez analizę restrykcyjną enzymami *SphI* /*NdeI* oraz *NheI*/*NcoI*. Rycina 12 przedstawia rozdział elektroforetyczny plazmidów poddanych analizie restrykcyjnej po 3 etapie ligacji z monomerem. Oczekiwana długość fragmentów restrykcyjnych na poszczególnych etapach klonowania przedstawiono w tabeli 4.1. Ponadto, sekwencję wstawki potwierdzono poprzez sekwencjonowanie na każdym etapie procesu klonowania.

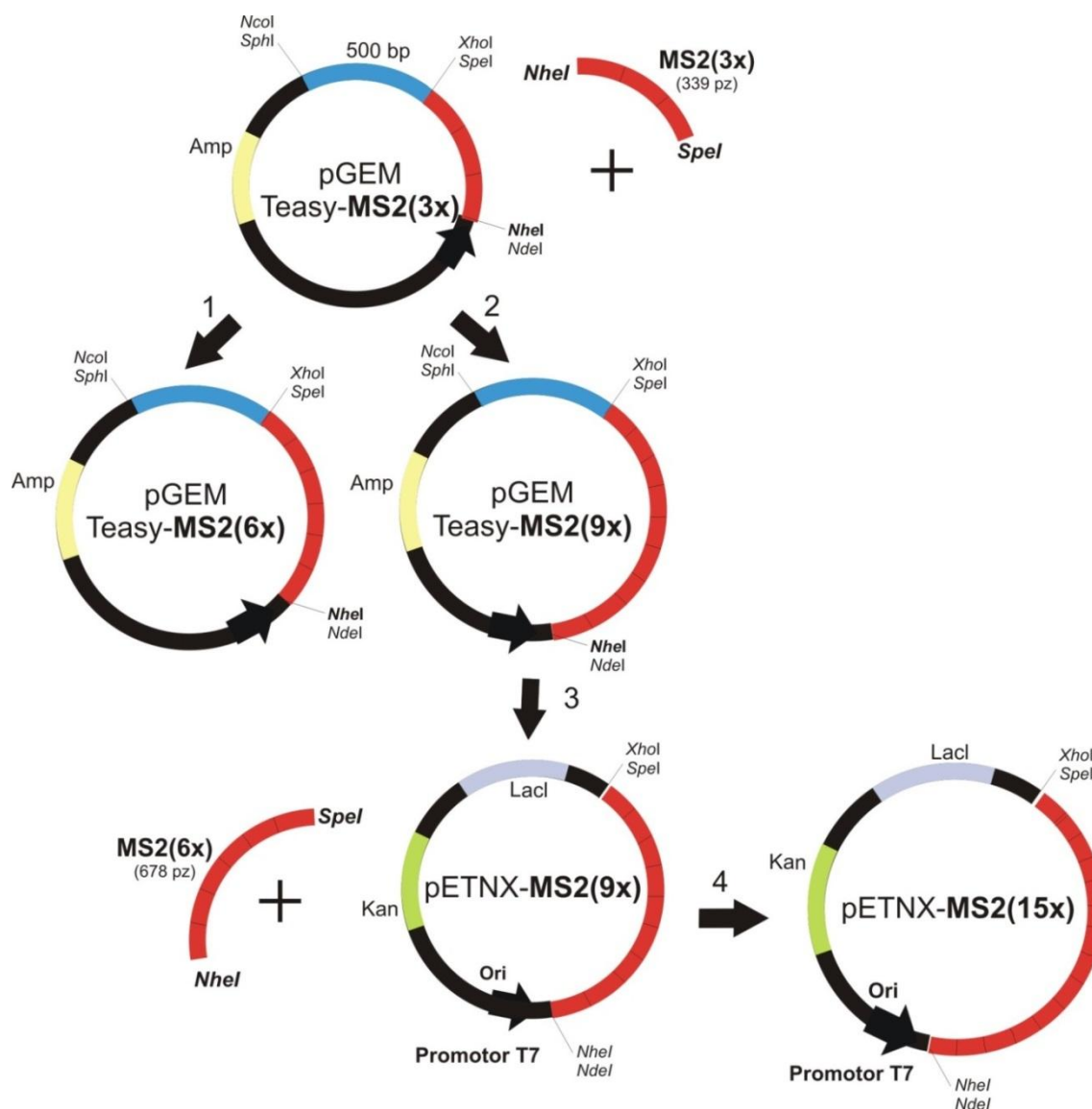
Tabela 4.1 Przewidywane długości fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia restrykcyjnego plazmidów

Plazmid	Enzymy restrykcyjne	Długości fragmentów restrykcyjnych
pGEM Teasy-MS2(3x)	<i>SphI</i> / <i>NdeI</i>	2942 + 870 pz.
	<i>NheI</i> / <i>NcoI</i>	2941 + 871 pz
pGEM Teasy-MS2(6x)	<i>SphI</i> / <i>NdeI</i>	2942 + 1209 pz
	<i>NheI</i> / <i>NcoI</i>	2941 + 1210 pz
pGEM Teasy-MS2(9x)	<i>SphI</i> / <i>NdeI</i>	2942 + 1548 pz
	<i>NheI</i> / <i>NcoI</i>	2941 + 1549 pz
pETNX-MS2(9x)	<i>XhoI</i> / <i>NdeI</i>	5233 + 1035 pz
	<i>NheI</i> / <i>SpeI</i>	5251 + 1017 pz
pETNX-MS2(15x)	<i>XhoI</i> / <i>NdeI</i>	5233 + 1713 pz
	<i>NheI</i> / <i>SpeI</i>	5251 + 1695 pz

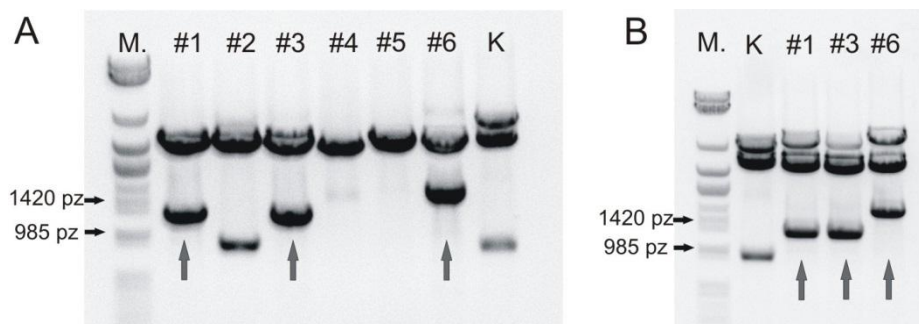


Rycina 12. Rozdział elektroforetyczny plazmidów pGEM Teasy MS2 (3x), po trawieniu enzymami restrykcyjnymi (A) *SphI*/*NdeI* – analiza obecności wstawki oraz (B) *NheI*/*NcoI* – analiza orientacji wstawki. Strzałki wskazują klony z poprawnie wklonowaną wstawką. M – marker masy DNA *AvaII* (A&A Biotechnology); K – kontrolny plazmid pGEM Teasy MS2(2x).

Kolejne etapy klonowania przeprowadzono według schematu przedstawionego na ryc. 13. Wstawkę MS2(3x) wycinano z otrzymanego wektora pGEM Teasy MS2(3x) za pomocą enzymów restrykcyjnych *NheI*/*SpeI* i ligowano do wektora pGEM Teasy MS2(3x) trawionego enzymem *NheI*. Otrzymano plazmidy pGEM Teasy MS2(6x) oraz pGEM Teasy MS2(9x) (ryc. 14).



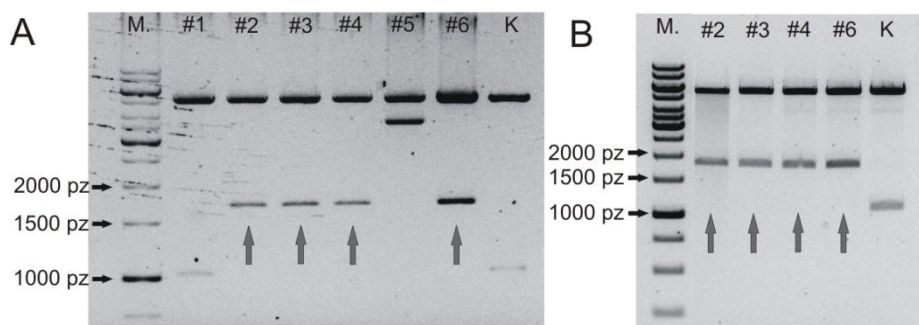
Rycina 13. Etapy klonowania konstruktów genowych kodujących białko MS2 przy użyciu restryktaz *NheI* i *SpeI*. 1) i 2) W wyniku ligacji plazmidu pGEM Teasy zawierającego trimer sekwencji MS2, z trimerem sekwencji MS2 otrzymano 6-mer oraz 9-mer sekwencji MS2. 3) Wstawkę kodującą 9-mer białka MS2 wytrawiono z plazmidu pGEM Teasy-MS2(9x) i wklonowano do plazmidu ekspresyjnego pETNX. 4) w wyniku ligacji plazmidu pETNX-MS2(9x) z wstawką 6-meru MS2 otrzymano 15 mer sekwencji MS2.



Rycina 14. Rozdział elektroforetyczny plazmidów po ligacji pGEM Teasy MS2(3x) z trimerem sekwencji MS2, po trawieniu enzymami A) *SphI/NdeI* – analiza obecności wstawki oraz B) *NheI/NcoI* – analiza orientacji wstawki. Strzałki wskazują klony z poprawnie wklonowaną wstawką. M – marker masy DNA *AvaII* (A&A Biotechnology); K – kontrolny plazmid pGEM Teasy MS2(3x). klon # 1 i #3 – plazmidy pGEM Teasy MS2(6x), klon # 6 – plazmid pGEM Teasy MS2(9x).

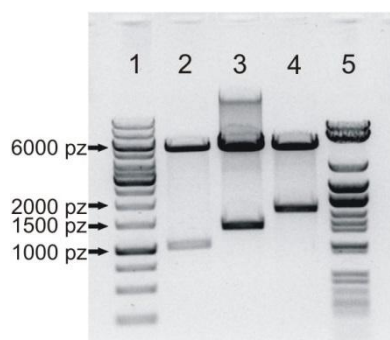
Z plazmidu pGEM Teasy MS2(9x) wycięto wstawkę MS2(9x) enzymami *NheI* i *SpeI* i wklonowano do wektora pETNX, który uprzednio trawiono enzymami *NheI* i *SpeI*. (ryc. 13, etap 3). Otrzymano konstrukct pETNX-MS2(9x) (ryc.13, etap 3)

Następnie, plazmid ten wytrawiono enzymem *NheI* i poddano ligacji z wstawką MS2(6x), którą uprzednio wytrawiono z plazmidu pGEM Teasy MS2(6x) (ryc. 13, etap 4). Wskutek ligacji otrzymano końcowy konstrukct pETNX-MS2(15x) (ryc. 15)



Rycina 15. Rozdział elektroforetyczny plazmidów pETNX-MS2(15x) po trawieniu enzymami (A) *XhoI/NdeI* – analiza obecności wstawki oraz (B) *NheI/SpeI* – analiza orientacji wstawki. Strzałki wskazują klony z poprawnie wklonowaną wstawką. M – marker masy DNA 1kB; K – kontrolny plazmid pETNX-MS2(9x).

Plazmidy ekspresyjne pETNX zawierające sztuczne geny kodujące białka jedwabiu pajęczego: MS1 (15-mer), MS2(9x) oraz MS2 (15-mer) przeniesiono na drodze transformacji termicznej do komórek szczepu ekspresyjnego bakterii *E. coli*: BLR (DE3). Poprawność sekwencji uzyskanych klonów potwierdzono poprzez analizę restrykcyjną enzymami *XhoI* i *NdeI* (ryc. 16) oraz sekwencjonowanie wyizolowanych plazmidów.



Rycina 16. Rozdział elektroforetyczny plazmidów ekspresyjnych pETNX zawierających geny kodujące bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczych, po trawieniu enzymami *XhoI/NdeI*. Ścieżki: 1 – marker wielkości 1 kB; 2 – pETNX-MS2(9x); 3 - pETNX-MS1(15x); 4 - pETNX-MS2(15x); 5 – marker wielkości *AvaII*

4.2 Produkcja bioinżynierowanych jedwabiu pajęczych

Bakterie BLR (DE3) zawierające plazmidy kodujące białka jedwabiu pajęczego namnażano w 5l. hodowli bioreaktorowej, po czym, poprzez dodanie analogu laktozy (IPTG) indukowano nadekspresję transgenicznych białek znajdujących się pod kontrolą operonu laktozowego. Uzyskano bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego: MS1 – będący 15 merem sekwencji konsensusowej spidroiny MaSp1 pająka *N. clavipes*, oraz dwa warianty białka oparte na sekwencji konsensusowej białka MaSp2: MS2(9x) - 9-mer i MS2 - 15-mer. Sekwencje aminokwasowe uzyskanych białek przedstawiono w tabeli 4.2.

Tabela 4.2 Sekwencje aminokwasowe i właściwości bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego MS1, MS2(9x) oraz MS2. Powtarzające się sekwencje konsensusowe umieszczono w nawiasach.

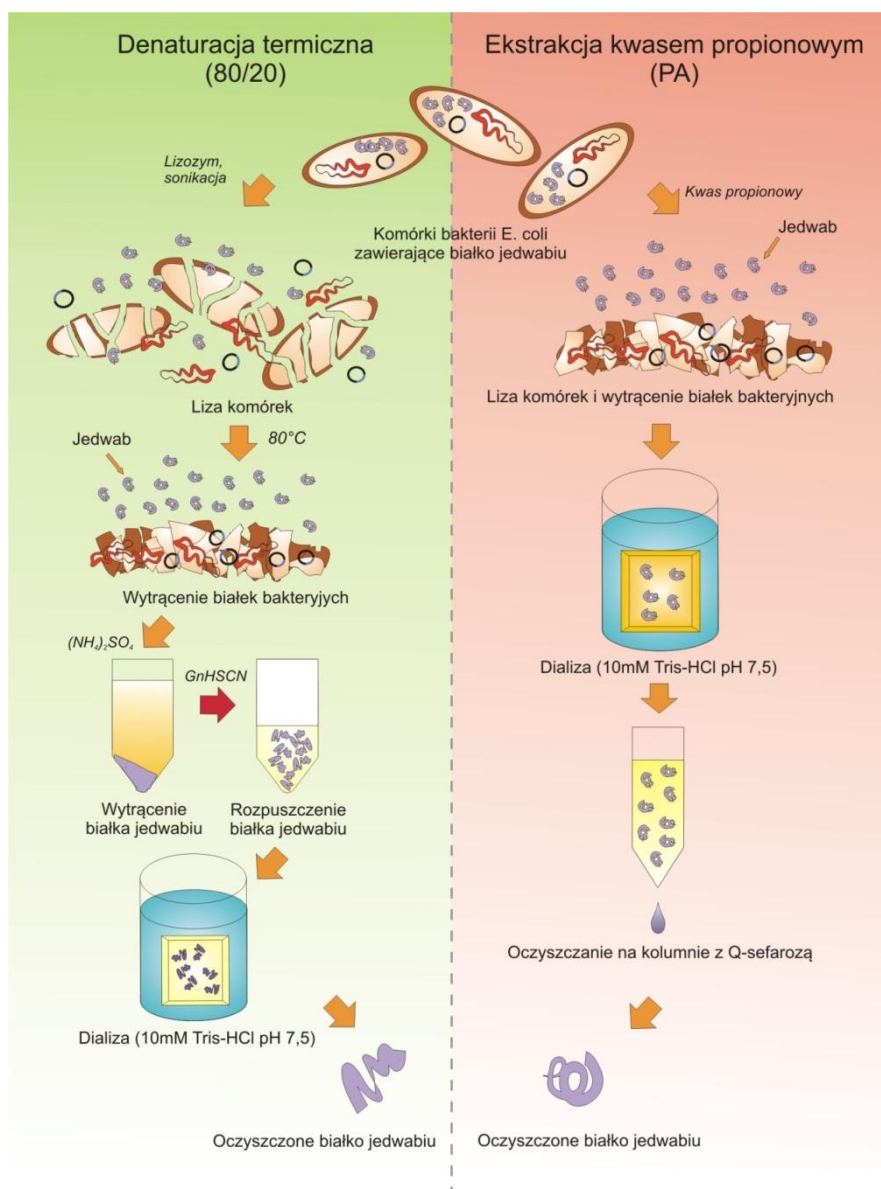
Nazwa	Sekwencja aminokwasowa	Masa cząsteczkowa [kDa]	Punkt izoelektryczny
MS1	MAS(GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGL GSQGTS) ₁₅	39,54	10,83
MS2(9x)	MAS(GPGGYGPGQQGSPGPGSAAAAAAGP YGPGQQT) ₉	28,15	5,27
MS2	MAS(GPGGYGPGQQGSPGPGSAAAAAAGP YGPGQQT) ₁₅	46,72	5,27

Niezależnie od produkowanego wariantu białka, z jednego litra hodowli bioreaktorowej otrzymywano średnio 50g osadu komórek bakteryjnych. Otrzymane białka wykorzystywano na poszczególnych etapach prezentowanej pracy.

4.3 Wpływ stosowanej metody oczyszczania białka na właściwości sfer

4.3.1 Metody oczyszczania

Bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego MS2(9x) oczyszczano za pomocą dwóch metod: denaturacji termicznej (80/20) oraz ekstrakcji kwasem propionowym (PA – z ang. *propionic acid*). Rycina 17 przedstawia schemat przebiegu zastosowanych metod oczyszczania.



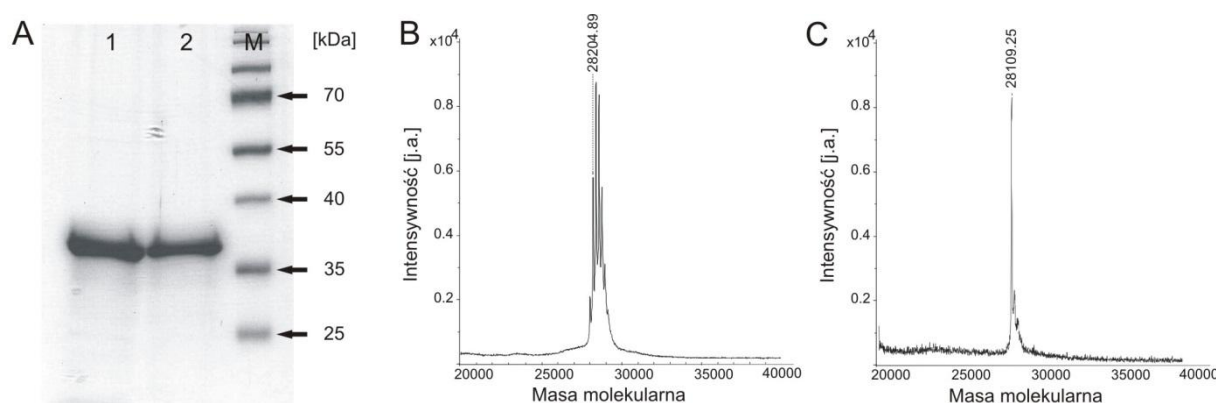
Rycina 17. Schemat metod oczyszczania bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego.

Metoda denaturacji termicznej (80/20): Komórki bakteryjne poddawano lizie enzymatycznej oraz sonikacji, a następnie białka bakteryjne denaturowano pod wpływem wysokiej temperatury (80°C), po czym oddzielano poprzez wirowanie. Białka jedwabiu wytrącano z roztworu za pomocą 20% siarczanu amonu, a następnie rozpuszczano w 6M tiocyjanianie guanidyny i dializowano do buforu 10mM Tris-HCl, pH 7,5;

Metoda ekstrakcji kwasem propionowym: Komórki bakteryjne zawieszano w stężonym kwasie propionowym, co powodowało ich lizę oraz wytrącenie się bakteryjnych białek. Białka te usuwano z zawiesiny poprzez wirowanie. Białko jedwabiu pozostające w supernatancie dializowano do buforu 10mM Tris-HCl, pH 7,5 oraz dodatkowo oczyszczano na kolumnie z Q-sefarozą, w celu usunięcia bakteryjnych lipopolisacharydów (LPS).

Za pomocą obu metod uzyskano porównywalną średnią wydajność oczyszczania wynoszącą: 2,14 mg i 2,26 mg z 1g mokrego osadu bakteryjnego, odpowiednio dla metody 80/20 i PA.

Analiza elektroforetyczna otrzymanych białek w 12,5% żelu poliakrylamidowym wykazała brak zanieczyszczeń białkami bakteryjnymi oraz brak degradacji białek jedwabiu (ryc. 18 A). Pomimo, iż białka migrowały w żelu niezgodnie z przewidywaną masą cząsteczkową (wyżej niż prążek 35 kDa markera masy białek), wynik spektrometrii masowej potwierdził teoretyczną masę białka MS2(9x) wynoszącą 28,15 kDa. (ryc. 18 B i C).



Rycina 18. (A) Analiza białka MS2(9x) oczyszczonego metodą 1 – 80/20 oraz 2 – PA w 12,5% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) w obecności markera masy białek Page Ruler (Fermentas) – M. (B) Analiza spektrometrii masowej (MALDI-TOF) białka MS2(9x) 80/20; (C) Analiza spektrometrii masowej (MALDI-TOF) białka MS2(9x) PA

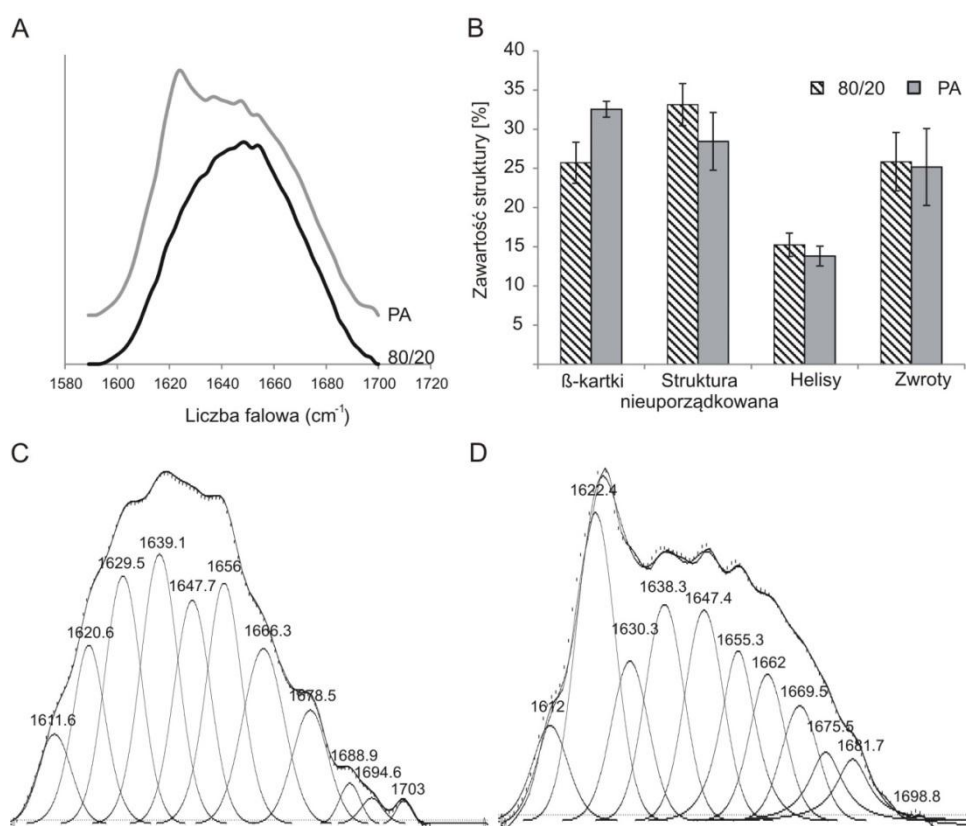
4.3.2 Właściwości rozpuszczalnego białka MS2(9x)

4.3.2.1 Spektroskopia podczerwieni (FTIR)

Strukturę drugorzędową rozpuszczalnego białka MS2(9x) oczyszczonego metodami 80/20 i PA analizowano za pomocą spektroskopii podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Analizowano charakterystyczne dla białek pasmo absorpcji zwane amidem I mieszczące się w zakresie falowym od 1600 – 1700 cm^{-1} . Za jego występowanie odpowiedzialne są głównie drgania rozciągające C=O oraz w niewielkim stopniu drgania wahadłowe N – H atomów tworzących wiązania peptydowe w łańcuchu białek. Są one zależne od konformacji przestrzennej łańcucha głównego białka, czyli jego struktury drugorzędowej.

Pasmo amidu I oryginalnych widm FTIR białek MS2(9x) 80/20 i PA (ryc. 19 A) poddano rozkładowi na poszczególne komponenty w oparciu o procedurę autodekonwolucji

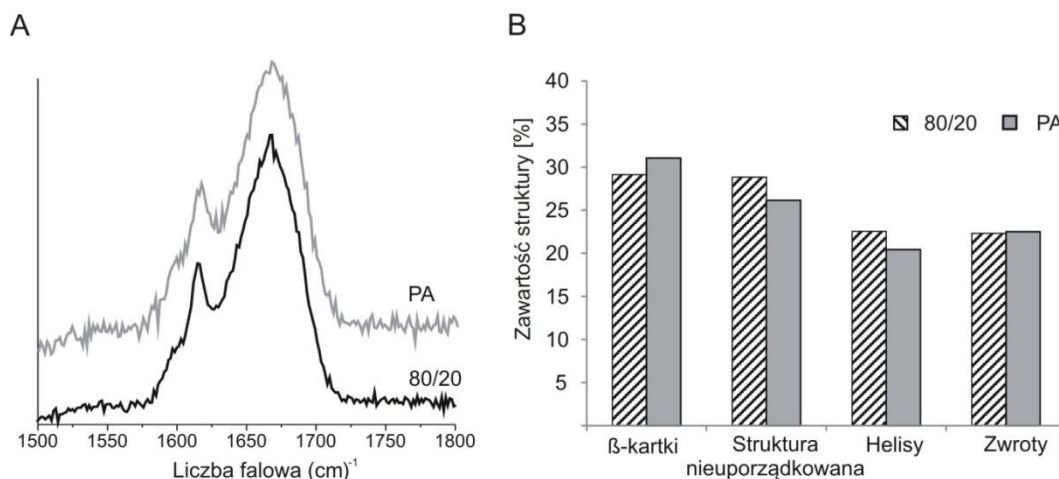
fourierowskiej FSD (ang. *Fourier Self-deconvolution*) oraz drugą pochodną widma. W ten sposób dopasowano po 11 pasm składowych pasma amidu I (ryc. 19 C i D), które następnie zostały przypisane do poszczególnych struktur zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 3.2. Ilościowa analiza udziału pasm składowych w paśmie amidu I wykazała, iż białko MS2(9x) PA posiadało więcej struktur β -kartki ($33\pm 1\%$) w porównaniu do białka MS2(9x) 80/20 ($26\pm 3\%$) (ryc. 19 B). Odwrotna zależność występowała w przypadku struktur nieuporządkowanych. Białka MS2(9x) 80/20 i PA zawierały odpowiednio $28\pm 4\%$ i $33\pm 3\%$ tych struktur. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zawartości struktur drugorzędowych w obu białkach (ryc. 19 B).



Rycina 19. Analiza struktury drugorzędowej białek MS2(9x) na podstawie spektroskopii FTIR. A) Widma absorpcji pasm amidu I białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA. B) Procentowa zawartość struktur drugorzędowych w białkach MS2(9x) określona na podstawie widm FTIR reprezentatywnych dla trzech eksperymentów. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej zawartości danej struktury; C) Dopasowanie pasm składowych do przykładowego widma amidu I białka MS2(9x) 80/20 poddanego dekonwolucji; D) Dopasowanie pasm składowych do przykładowego widma amidu I białka MS2(9x) PA poddanego dekonwolucji.

4.3.2.2 Spektroskopia Ramana

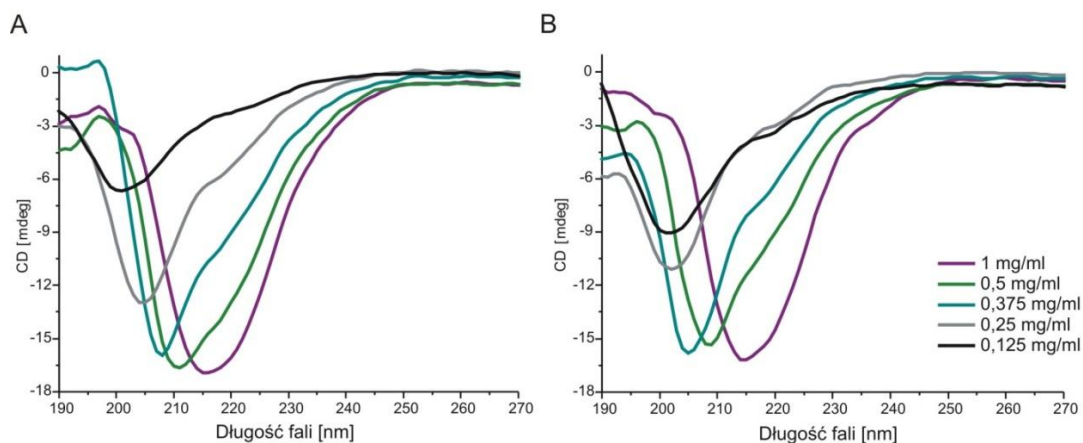
Analiza zawartości struktur drugorzędowych metodą spektroskopii Ramana wykazała, że białko MS2(9x) 80/20 posiadało mniej struktur β -kartki (29,11%) a więcej struktur nieuporządkowanych (28,82%) w porównaniu do białka MS2(9x) PA, dla którego uzyskano odpowiednio 31,06% i 26,16% zawartości tych struktur (ryc. 20)



Rycina 20. Analiza struktury drugorzędowej białek MS2(9x) za pomocą spektroskopii Ramana. (A) Widma absorpcji pasm amidu I białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA; (B) Procentowa zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych w sferach MS2(9x) na podstawie reprezentatywnych widm.

4.3.2.3 Dichroizm kołowy

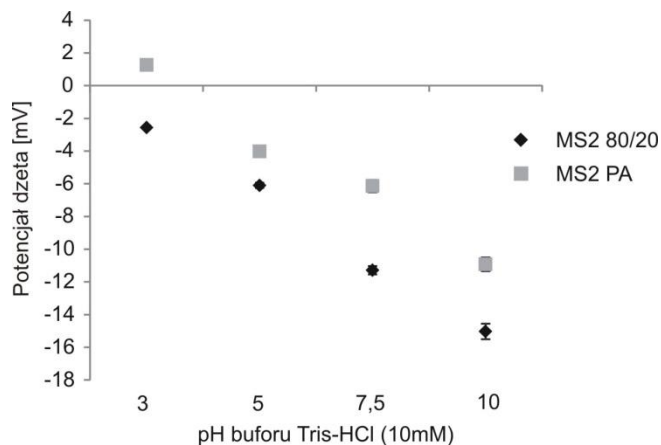
Analiza widm dichroizmu kołowego białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA nie wykazała różnic w strukturze drugorzędowej obu białek. Zaobserwowano zmiany kształtu widm w zależności od stężenia białka użytego do pomiaru. Wraz ze zmniejszaniem się stężenia białek minimum obserwowane przy długości fali 215 nm przesuwało się w kierunku niższych długości fali. Zmiany takie wykazują na stopniowe zwiększanie się zawartości struktur nieuporządkowanych w badanych białkach.



Rycina 21. Analiza zawartości struktur drugorzędowych białek MS2(9x) za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Widma dichroizmu białek A) MS2(9x) 80/20 i B) MS2(9x) PA w zakresie stężeń od 1 do 0,125 mg/ml

4.3.2.4 Pomiar potencjału elektrokinetycznego (dzeta)

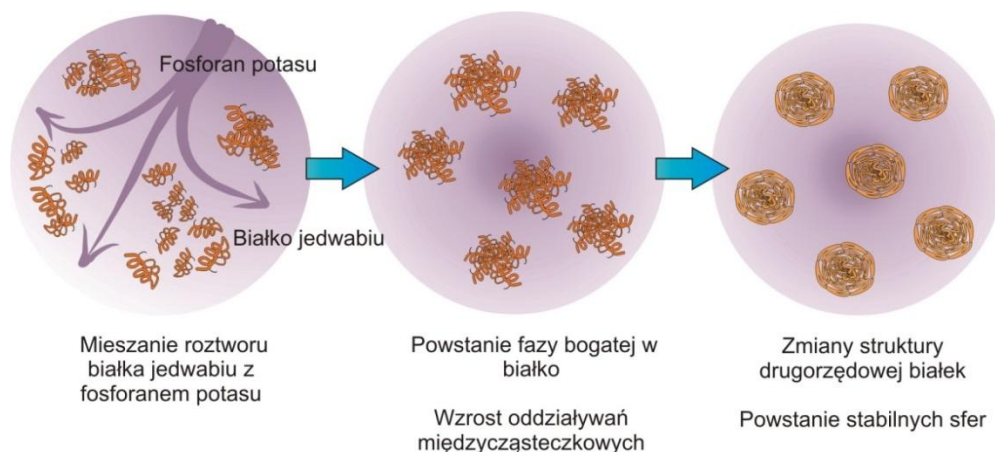
Analiza potencjału dzeta białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA w zależności od pH środowiska wykazała, że we wszystkich analizowanych warunkach białko MS2(9x) 80/20 posiada niższy o średnio 4mV potencjał dzeta niż białko MS2(9x) PA. Potencjał dzeta obu białek obniżał się wraz ze wzrostem pH środowiska.



Rycina 22. Potencjał dzeta białek MS2(9x) 80/20 i PA mierzony w 10mM buforu Tris-HCl o pH 4,5, 6, 7,5 oraz 10 w temp. 25°C.

4.3.3 Wytwarzane sfer

Z białek oczyszczonych obiema metodami wytworzono sfery wykorzystując metodę wysalania jonami fosforanowymi. Schematyczny przebieg formowania się sfer pod wpływem mieszania z fosforanem potasu przedstawiono na rycinie 25.

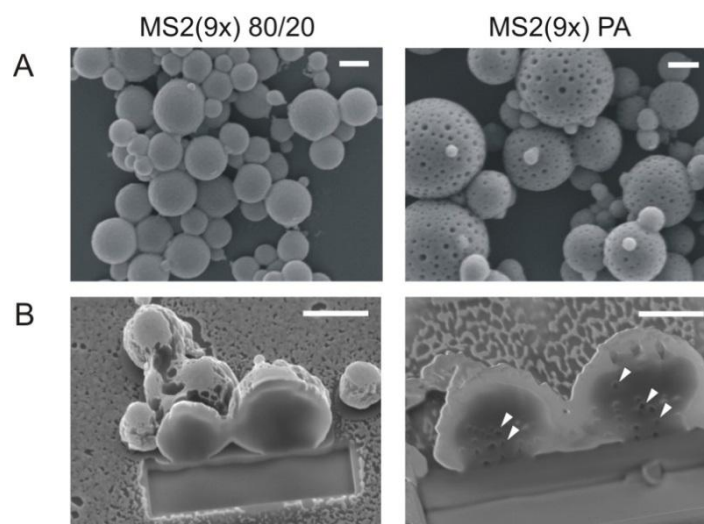


Rycina 23. Schemat mechanizmu powstawania sfer z bioinżynierowanego jedwabiu pająkowego poprzez wysalanie białek jedwabiu kosmotropowymi jonami fosforanowymi.

Oba warianty białka MS2(9x): oczyszczane metodą termiczną – MS2(9x) 80/20 oraz oczyszczane metodą ekstrakcji kwasowej – MS2(9x) PA tworzyły sfery w wyniku mieszania z fosforanem potasu (ryc. 24).

4.3.4 Analiza morfologii sfer MS2(9x) 80/20 i PA

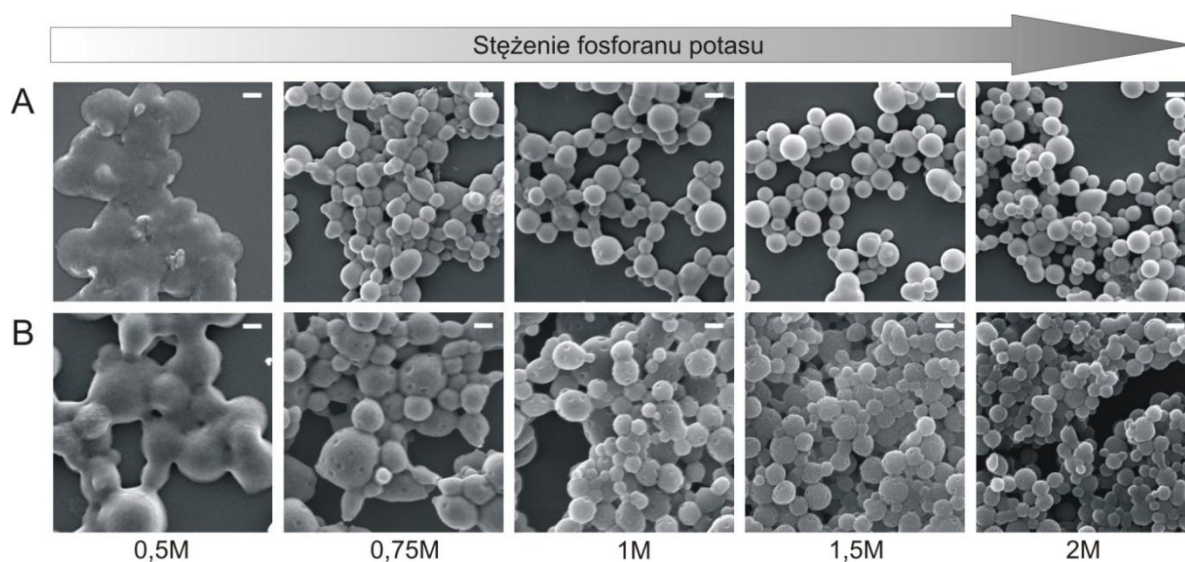
Sfery wytworzone z białka MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA różniły się pod względem morfologii. Sfery MS2(9x) 80/20 posiadały gładką powierzchnię oraz mniejszy rozmiar, natomiast sfery MS2(9x) PA miały porowatą powierzchnię i były zawsze większe niezależnie od warunków formowania sfer. Wytrawianie sfer skupioną wiązką jonów wykazało porowatą strukturę wewnętrzną sfer MS2(9x) PA. Nie obserwowano porów we wnętrzu sfer MS2(9x) 80/20 (ryc. 26).



Rycina 24. Sfery MS2(9x) 80/20 oraz MS2(9x) PA wytwarzane za pomocą mieszania roztworu białka jedwabiu (5mg/ml) z 2M fosforanem potasu pH 8: A) sfery obrazowane za pomocą SEM; B) sfery po wytrawianiu skupioną wiązką jonów obrazowane za pomocą SEM. Strzałki wskazują pory we wnętrzu sfer MS2(9x) PA. Skala: 1 μ m.

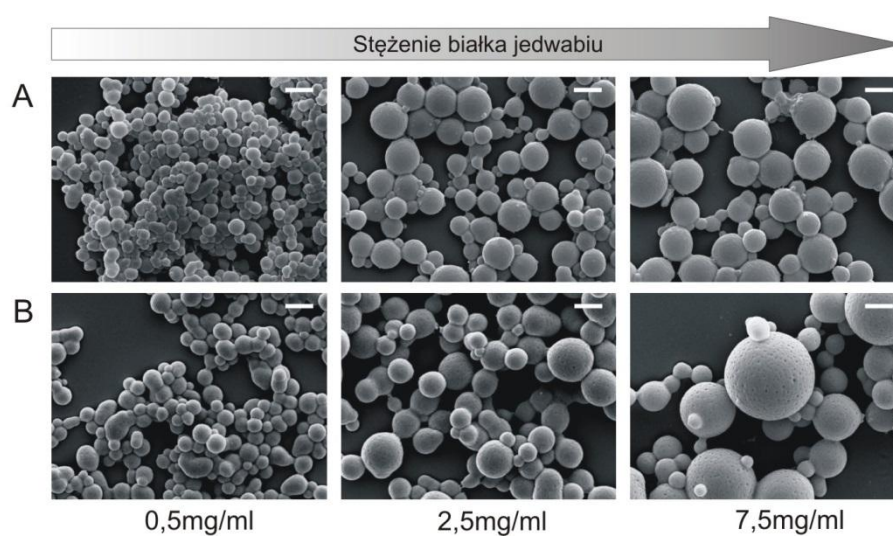
W celu analizy czynników wpływających na właściwości sfer, do wysalania białka jedwabiu stosowano różne stężenia fosforanu potasu (ryc. 25), stężenia białka jedwabiu (ryc. 26) oraz różne pH buforu fosforanowego (ryc. 27).`

Stężenie fosforanu potasu znacząco wpływało na morfologię sfer (ryc. 25). W najniższym badanym stężeniu buforu (0,5M) białko jedwabiu nie formowało sferycznych cząstek a jedynie agregaty o nieregularnych, płaskich kształtach. W stężeniu fosforanu wnoszącym 0,75 M białko jedwabiu tworzyło sferyczne cząstki wykazujące skłonność do agregacji. W stężeniach wyższych niż 0,75M obserwowano natomiast sfery o regularnym, okrągłym kształcie.



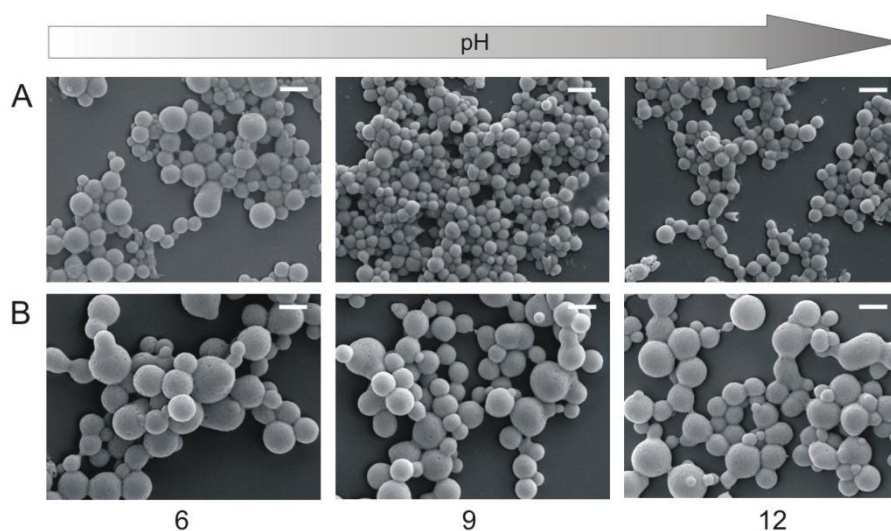
Rycina 25. Sfery formowane z białek A) MS2(9x) 80/20 oraz B) MS2(9x) PA o początkowym stężeniu 2,5 mg/ml i w różnych stężeniach buforu fosforanowego o pH 8, w stosunku mieszania 1:10. Skala: 1 μ m.

Zastosowanie różnych początkowych stężeń białka jedwabiu nie wpłynęło na kształt i strukturę powierzchni otrzymywanych sfer (ryc. 26).



Rycina 26. Sfery formowane z białek A) MS2(9x) 80/20 oraz B) MS2(9x) PA o różnych początkowych stężeniach za pomocą wysalania 2M fosforanem potasu pH 8. Skala: 1 μ m.

Badania morfologii sfer wytwarzanych 1,75M fosforanie potasu o pH w zakresie od 6 do 12 nie wykazały wpływu pH na morfologię sfer (ryc. 27).



Rycina 27. Sfery formowane z białek A) MS2(9x) 80/20 oraz B) MS2(9x) PA o początkowym stężeniu 2,5 mg/ml wytwarzane w 2M fosforanie potasu o różnym pH. Skala: 1 μ m.

4.3.5 Analiza rozmiaru sfer MS2(9x) 80/20 i PA

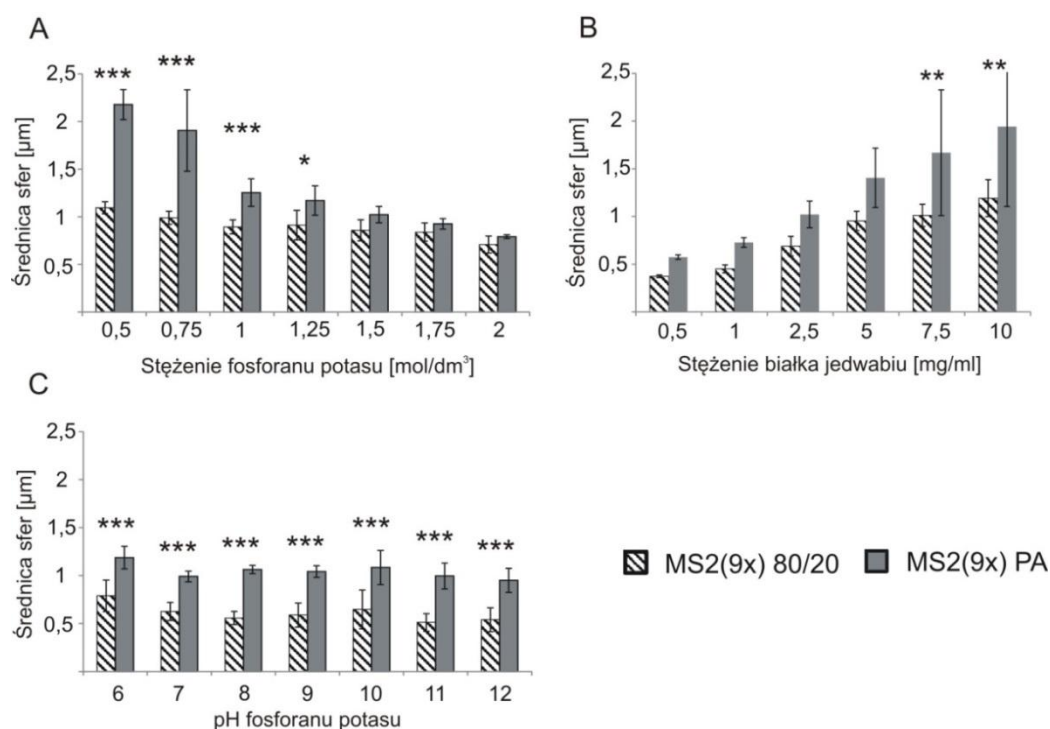
W celu oceny średniego rozmiaru wytworzonych sfer oraz rozrzutu ich wielkości dokonano pomiarów min. 120 sfer obrazowanych na losowo wybranych, reprezentatywnych mikro fotografiach SEM dla 3 niezależnych eksperymentów.

Zastosowanie fosforanu potasu o wyższym stężeniu wpłynęło na redukcję średniego rozmiaru otrzymywanych sfer, niezależnie od zastosowanego białka (ryc. 28 A). Przy stężeniu fosforanu potasu niższym niż 1,25M obserwowano, iż białko MS2(9x) PA formuje znacząco większe sfery niż białko MS2(9x) 80/20. W przypadku sfer wytwarzanych w stężeniach wyższych niż 1,25M, sfery MS2(9x) PA były również większe, jednak różnica nie była istotna statystycznie.

Średnia wielkość obu typów sfer zwiększała się wraz ze wzrostem początkowego stężenia białka jedwabiu (ryc. 28 B). W zakresie stężeń od 0,5 mg/ml do 10 mg/ml, średnia wielkość sfer wzrosła z 370 nm (\pm 100 nm) do 1,2 μ m (\pm 0,44 μ m) w przypadku sfer MS2(9x) 80/20 oraz z 562 nm (\pm 121 nm) do 1,78 μ m (\pm 1,45 μ m) dla sfer MS2(9x) PA. Różnica we wielkościach sfer była istotna statystycznie tylko dla stężeń 7,5 i 10 mg/ml.

pH buforu fosforanowego nie wpłynęło na rozmiar otrzymywanych sfer (ryc. 28 C). Różnica wielkości sfer formowanych z białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA była istotna statystycznie w zakresie stężeń fosforanu potasu – od 0,5 do 1,25 M, w zakresie stężeniach

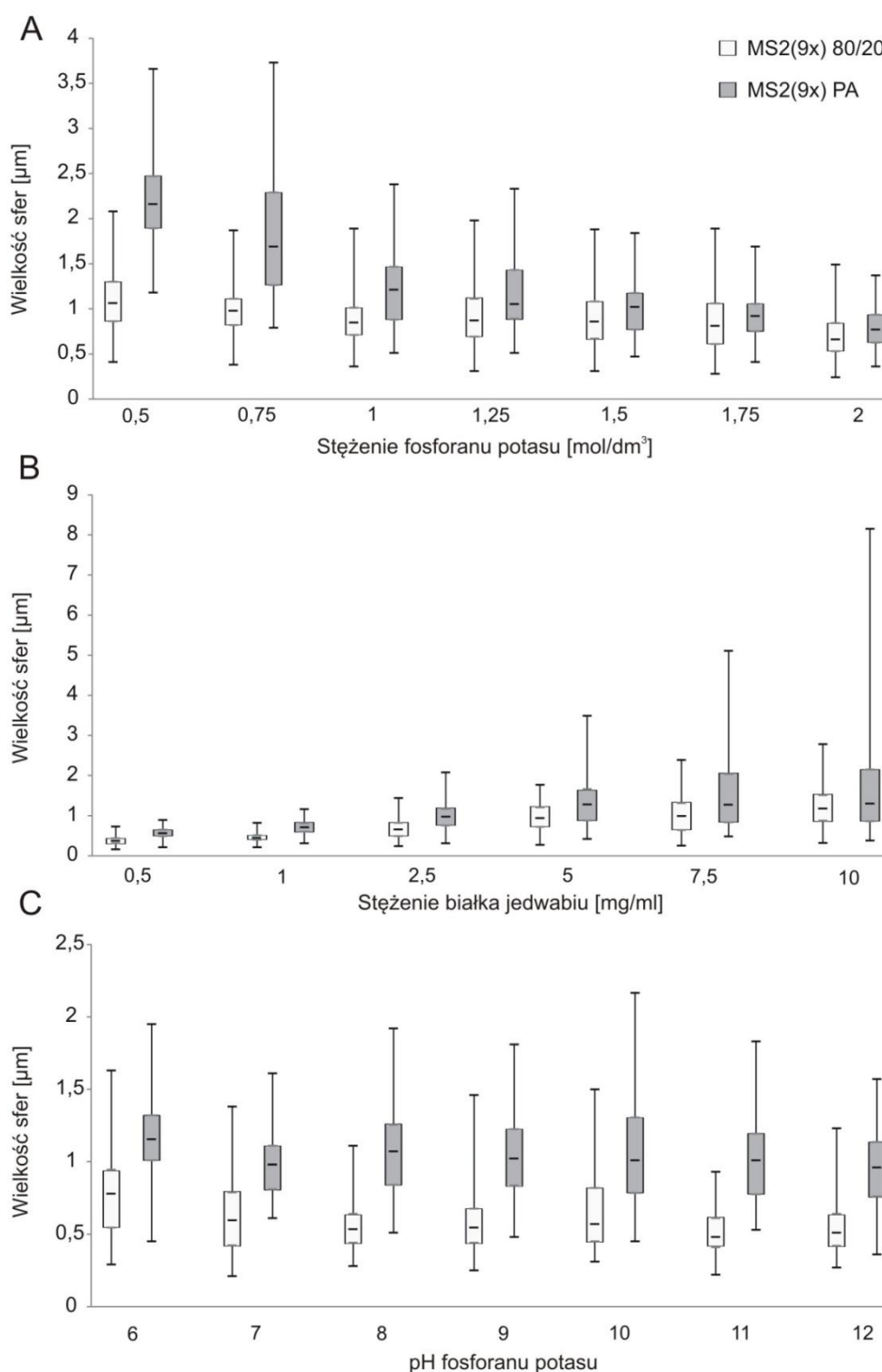
jedwabiu 7,5 i 10 mg/ml oraz w całym zakresie pH fosforanu potasu. Niezależnie od badanego pH wytwarzania sfer, różnice pomiędzy wielkościami obu typów sfer były istotne statystycznie.



Rycina 28. Rycina 28. Średni rozmiar sfer uzyskany poprzez pomiary średnicy sfer na mikro fotografiach SEM. Sfery wytwarzane były w różnych warunkach: A) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej wielkości sfer; * oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,001$. Eksperyment wykonano trzykrotnie.

Zakres wielkości sfer był zależny od warunków wytwarzania sfer i rodzaju białka. Dystrybucja wielkości sfer w obrębie próby zmniejszała się w przypadku sfer MS2(9x) PA wytwarzanych w zakresie 0,5 – 2 M fosforanie potasu, podczas gdy zarówno mediana jak i rozrzut wielkości sfer MS2(9x) 80/20 pozostawał na podobnym poziomie (ryc. 29 A).

W wyniku formowania sfer z roztworów białek jedwabiu MS2(9x) 80/20 i PA w niskich stężeniach (0,5 i 1 mg/ml) otrzymano jednorodną próbę cząstek o wąskim rozrzucie wielkości (ryc. 29 B). W przypadku obu białek, wraz ze wzrostem stężenia jedwabiu zakres wielkości powiększał się, jak również wzrastały wielkości maksymalne rozmiaru cząstek. W przypadku sfer PA powstawały pojedyncze bardzo duże sfery. Analiza zakresu wielkości sfer wytwarzanych w fosforanie potasu o różnych wartościach pH nie wykazała wpływu tego czynnika na zakres rozmiaru otrzymywanych sfer (ryc. 29 C).

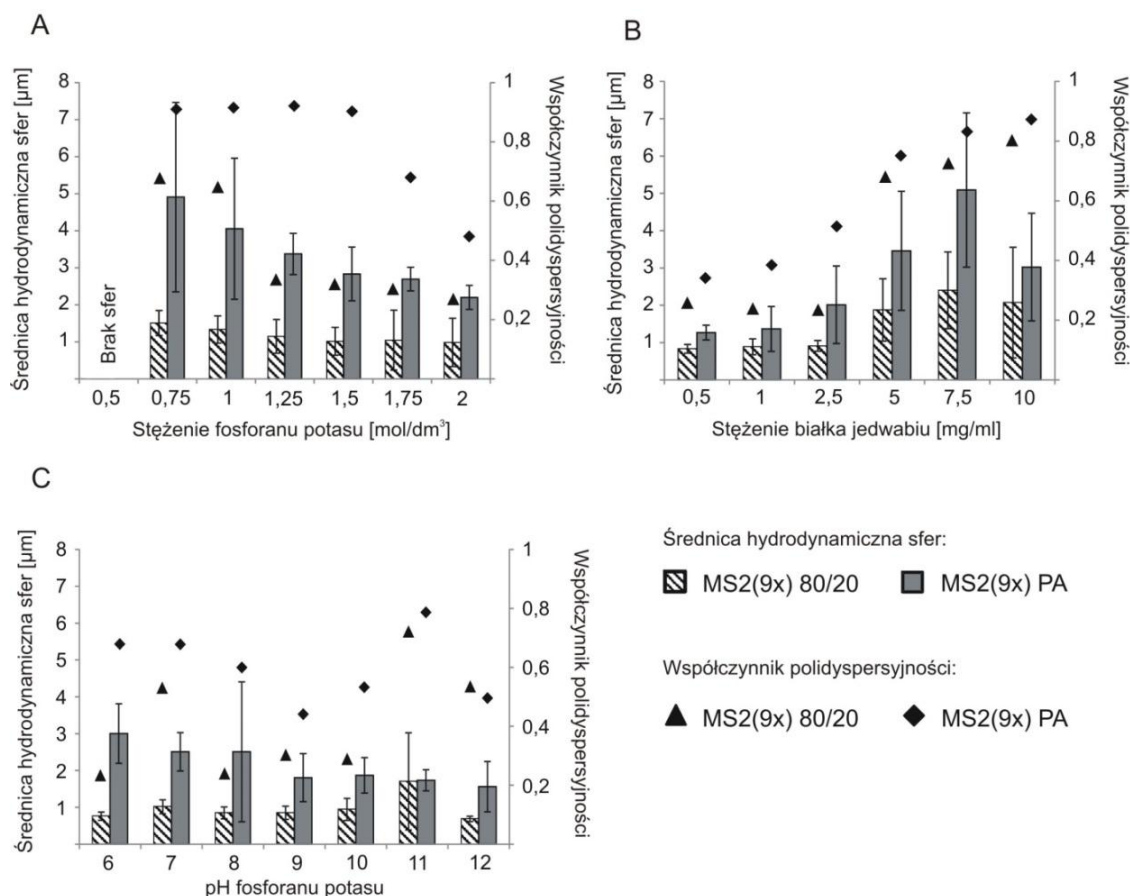


Rycina 29. Zakres wielkości sfer na podstawie pomiarów średnicy. Sfery formowane z: A) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartył, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartył średnicy sfer. Linia wewnątrz pudełka oznacza medianę.

Wielkość sfer uzyskanych w różnych warunkach analizowano również za pomocą dynamicznego rozpraszania światła. Metoda ta pozwala wyznaczyć wartość średnicy hydrodynamicznej cząsteczek zawieszonych w roztworze wodnym oraz ich współczynnik polidispersyjności (PI – z ang. *polydispersity index*). Wartości współczynnika PI zawiera się w zakresie 0 – 1, gdzie 0 oznacza zawiesinę cząstek o jednakowych wielkościach a 1 oznacza zawiesinę cząstek o bardzo zróżnicowanych rozmiarach.

Średnica hydrodynamiczna sfer zmniejszała się wraz ze wzrastającym stężeniem fosforanu potasu, natomiast malała wraz ze stężeniem białka użytego do wytwarzania sfer. Niezależnie od warunków formowania sfer, sfery MS2(9x) PA charakteryzowały się większą średnicą hydrodynamiczną i wyższymi wartościami PI niż sfery MS2(9x) PA. Średnica hydrodynamiczna sfer MS2(9x) 80/20 wytwarzanych w różnych stężeniach fosforanu potasu wynosiła w zakresie od 1,5 μm (0,75M fosforanu potasu) do 0,9 μm (2M fosforanu potasu), natomiast dla sfer MS2(9x) PA średnica hydrodynamiczna wynosiła w zakresie od 4,9 μm do 2,2 μm (odpowiednio dla stężeń fosforanu potasu od 0,75 i do 2M) (ryc. 30 A).

Sfery wytwarzane z białek MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA o stężeniu 0,5 mg/ml miały średnią średnicę hydrodynamiczną odpowiednio 0,83 i 1,26 μm . Wielkość średnicy hydrodynamicznej wzrosła odpowiednio do 2,4 i 5 μm dla stężenia białek jedwabiu 7,5 mg/ml (ryc. 30 B). Średnica hydrodynamiczna sfer oraz wartość PI nie była zależna od pH fosforanu potasu (ryc. 30 C). Wraz ze wzrostem stężenia białek oraz w niższych stężeniach fosforanu potasu obserwowano wzrost wartości współczynnika polidispersyjności białkowych sfer, co wskazywało na zakres wielkości otrzymywanych sfer. Sfery MS2(9x) 80/20 wykazywały niższe wartości współczynnika polidispersyjności, co wskazywało ich większą jednorodność.



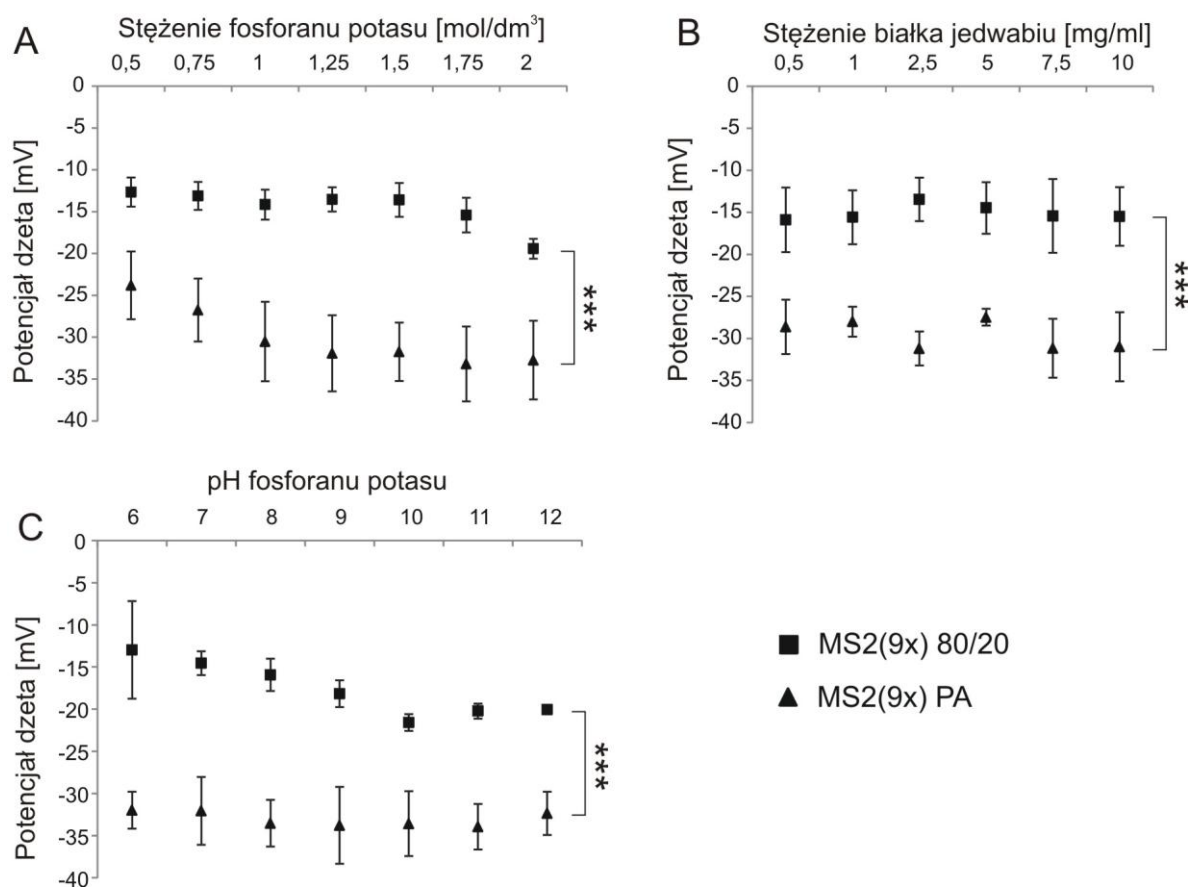
Rycina 30. Średnica hydrodynamiczna i współczynnik polidispersyjności sfer MS2(9x) 80/20 i PA. Sfery wytwarzane były w różnych warunkach: A) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej średnicy hydrodynamicznej.

4.3.6 Analiza potencjału elektrokinetycznego sfer MS2(9x)

Potencjał elektrokinetyczny (potencjał dzeta) występuje w zawiesinie cząstek na granicy dwóch warstw jonów otaczających cząstkę: warstwy jonów trwale zaabsorbowanych na powierzchni cząstki oraz warstwy rozmytej. Określenie potencjału dzeta pozwala określić ładunek powierzchniowy cząstek w danym roztworze.

Sfery MS2(9x) 80/20 oraz MS2(9x) PA posiadały ujemny potencjał dzeta w roztworze o obojętnym pH (ryc. 31). Wielkość potencjału istotnie różniła się pomiędzy oboma typami sfer we wszystkich testowanych warunkach wytwarzania. Średnie wartości potencjału dzeta sfer MS2(9x) 80/20 wahały się w granicach -27 do -33 mV. Sfery MS2(9x) PA, natomiast wykazały potencjał dzeta w zakresie -13 do -19 mV (ryc. 31).

Oba rodzaje sfer wytwarzanych w niskich stężeniach fosforanu potasu (0,5 i 0,75 M) wykazywały wyższy o 6 – 9 mV średni potencjał dzeta od sfer wytwarzanych w 2M fosforanie potasu (ryc. 31 A). Nie obserwowano zmian potencjału elektrokinetycznego w przypadku sfer wytworzonych w różnych stężeniach białka jedwabiu dla obu rodzajów sfer (ryc. 31 B). pH buforu fosforanowego użytego do wytwarzania sfer nie wpłynęło na potencjał elektrokinetyczny sfer MS2(9x) 80/20, natomiast w przypadku sfer MS2(9x) PA obserwowano spadek potencjału sfer wytworzonych w pH 10 i wyższym (ryc. 31 C).



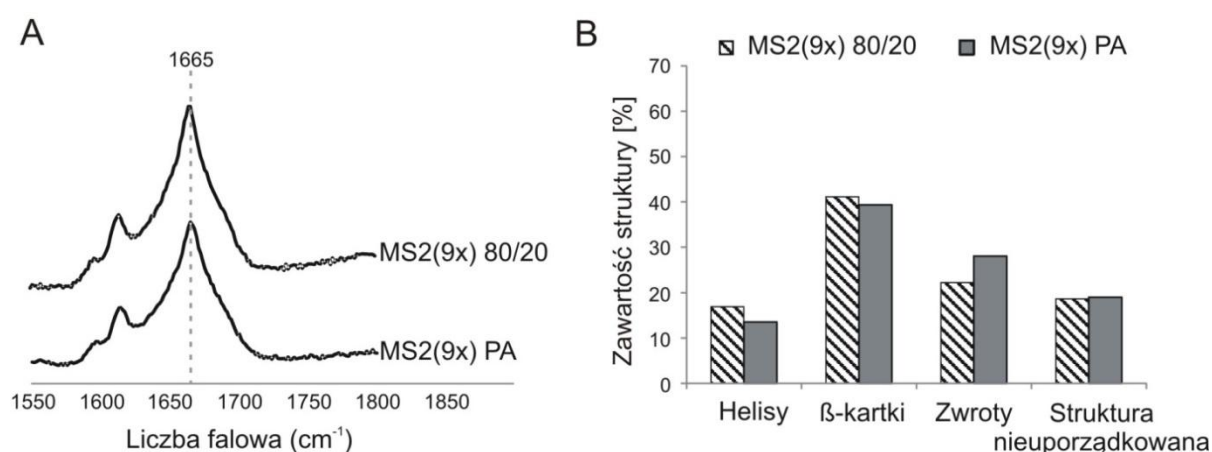
Rycina 31. Potencjał dzeta sfer MS2(9x) mierzony w zawieszynie wodnej w temp. 25°C. Sfery wytworzono z: A) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 2,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej wartości potencjału dzeta. *** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.001$. Eksperyment wykonano trzykrotnie, w trzech powtórzeniach.

4.3.7 Analiza struktury drugorzędowej sfer MS2(9x)

Podobnie jak strukturę drugorzędową rozpuszczalnego białka, strukturę sfer oceniono za pomocą spektroskopii Ramana oraz spektroskopii FTIR.

4.3.7.1 Spektroskopia Ramana

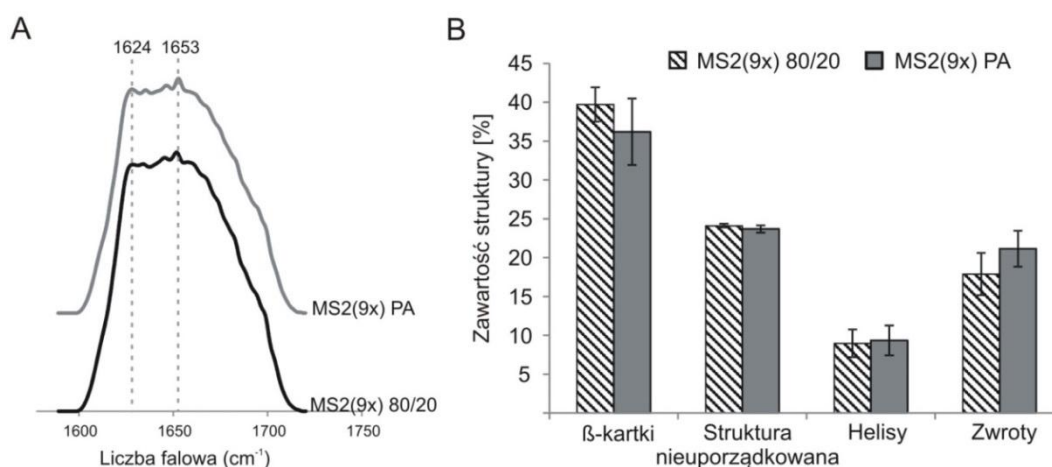
Analiza widma spektroskopii Ramana struktury drugorzędowej sfer nie wykazała istotnych różnic pomiędzy dwoma typami sfer. W obrazie widma obu typów sfer pojawił się dominujący pik na wysokości 1665 cm^{-1} świadczący o znacznej zawartości struktury β -kartki (ryc. 32 A). Analiza reprezentatywnych widm poddanych dekonwolucji wykazała 41 i 39 % struktury β -kartki odpowiednio w sferach MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA. Zawartość pozostałych struktur przedstawiono na ryc. 32 B oraz w tabeli 4.3.



Rycina 32. Analiza struktury drugorzędowej sfer MS2(9x) za pomocą spektroskopii Ramana. A) Widma absorpcji pasm amidu I sfer MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA. Zaznaczono pik 1665 cm^{-1} charakterystyczny dla struktury β -kartki; B) Procentowa zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych w sferach MS2(9x) na podstawie reprezentatywnych widm.

4.3.7.2 Spektroskopia podczerwieni (FTIR)

Analiza struktury drugorzędowej za pomocą spektroskopii podczerwieni również nie wykazała istotnych różnic pomiędzy dwoma typami sfer MS2(9x). Widma uzyskane dla sfer MS2(9x) posiadały pasma świadczące o obecności struktury β -kartki (pik na wysokości 1624 cm^{-1}), oraz struktur nieuporządkowanych (reprezentowanych przez pik 1653 cm^{-1}) (ryc. 33 A). Procentowa zawartość struktur drugorzędowych uzyskana na drodze dekonwolucji otrzymanych widm została przedstawiona na ryc. 33 B oraz w tabeli 4.3.



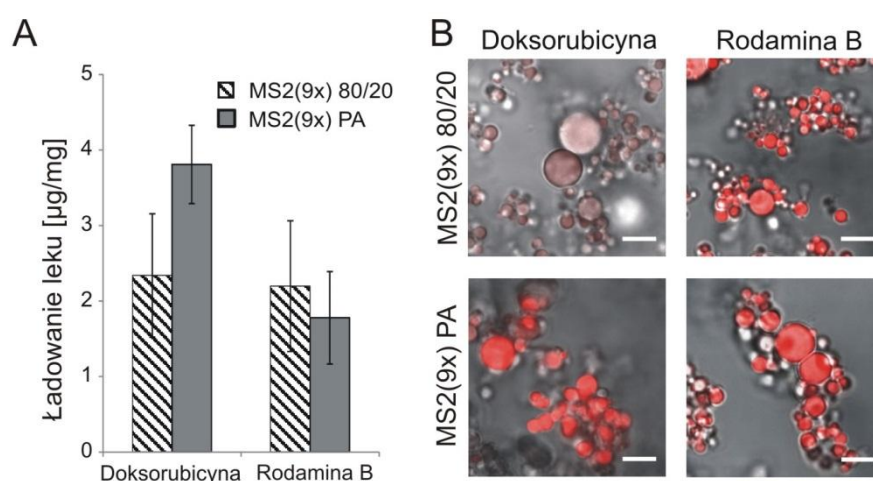
Rycina 33. Analiza struktury drugorzędowej sfer MS2(9x) za pomocą spektroskopii FTIR. A) Widma absorpcji pasm amidu I sfer MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA. Zaznaczono piki 1624 cm^{-1} i 1653 cm^{-1} charakterystyczne, odpowiednio, dla struktury β -kartki oraz struktury nieuporządkowanej; B) Procentowa zawartość struktur drugorzędowych w sferach MS2(9x) na podstawie widm FTIR reprezentatywnych dla trzech eksperymentów. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej zawartości danej struktury.

Tabela 4.3. Zawartość struktur drugorzędowych w sferach MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA na podstawie spektroskopii Ramana oraz spektroskopii FTIR.

Struktura drugorzędowa:	Raman		FTIR	
	MS2(9x) 80/20	MS2(9x) PA	MS2(9x) 80/20	MS2(9x) PA
β -kartki	41,2%	39,3%	39,7%	36,2%
struktura nieuporządkowana	18,7%	19,0%	24,1%	23,7%
Helisy	16,9%	13,5%	9,0%	9,4%
β -zwroty i pętle	22,2%	28,1%	17,9%	21,1%

4.3.8 Badanie zdolności wiązania modelowych leków

Stosowana metoda oczyszczania białka jedwabiu miała wpływ na efektywność ładowania leków do sfer zbudowanych z bioinżynierowanych białek jedwabiu. W analizie inkorporacji leków do sfer MS2(9x) jako modelowe leki stosowano barwnik fluorescencyjny Rodaminę B oraz chemioterapeutyk o właściwościach fluorescencyjnych – dokсорubicynę. Rodamina B wykazała podobny poziom inkorporacji do obu typów sfer (2,2 i 1,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ sfer odpowiednio dla MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA). Dokсорubicyna łądowała się we większej ilości do sfer MS2(9x) PA (3.9 μg na 1 mg sfer) w porównaniu do sfer MS2(9x) 80/20, gdzie załadowało się 2.3 μg leku na 1 mg sfer (ryc.34 A). Sfery z lekiem obrazowano pod mikroskopem konfokalnym. Sygnał fluorescencji modelowego leku był widoczny w obu typach sfer ładowanych rodaminą B oraz w sferach MS2(9x) PA ładowanych dokсорubicyną (ryc. 34 B). Sygnały fluorescencji leków obserwowano w całej objętości sfer. Sfery MS2(9x) 80/20 wykazały słaby sygnał fluorescencji pochodzący od dokсорubicyny (ryc. 34 B).



Rycina 34. Inkorporacja modelowych leków: rodaminy B oraz dokсорubicyny do sfer MS2(9x) A) Ilość modelowego leku inkorporowanego do 1mg sfer MS2(9x). Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej z trzech powtórzeń eksperymentu; B) Sfery MS2(9x) 80/20 i MS2(9x) PA ładowane rodaminą B oraz dokсорubicyną. Sfery obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego w białym świetle przechodzącym, fluorescencję modelowych leków obrazowano przy długości fali wzbudzenia/emisji 554/628 dla rodaminy B oraz 488/590 dla dokсорubicyny. Skala: 5 μm .

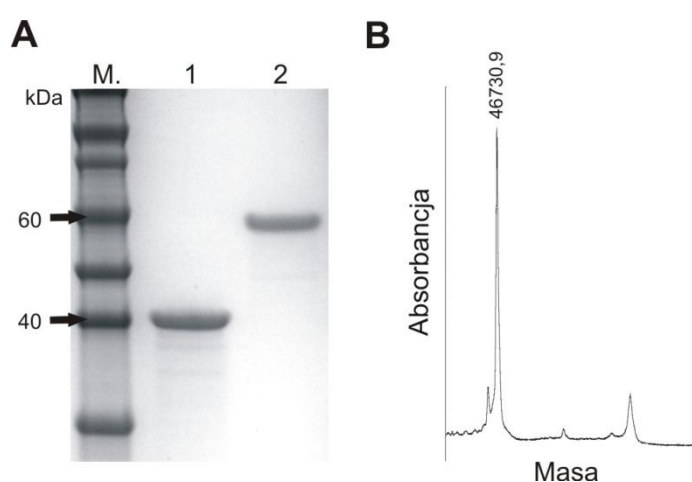
4.4 Wpływ sekwencji bioinżynierowanego białka jedwabiu na właściwości sfer

Kolejnym etapem pracy była ocena wpływu sekwencji bioinżynierowanego białka jedwabiu pajęczego na właściwości otrzymywanych sfer oraz ich potencjału jako nośnika leków przeciwnowotworowych. Analizie poddano sfery otrzymane z białek MS1 oraz MS2 będących 15-merami sekwencji bazującej na fragmentach białek MaSp1 i MaSp2 pająka *Nephila clavipes*. Sekwencje aminokwasowe białek MS1 i MS2 przedstawiono w tabeli 4.2

4.4.1 Oczyszczanie bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego

Białka MS1 oraz MS2 oczyszczano metodą denaturacji termicznej (80/20). Średnia wydajność oczyszczania wyniosła 1,71 i 1,57 mg białka jedwabiu na 1 gram mokrego osadu bakteryjnego, odpowiednio dla białek MS1 oraz MS2. Analiza elektroforetyczna w 12,5% żelu SDS-PAGE białek MS1 i MS2 nie wykazała zanieczyszczeń białkami bakteryjnymi i oznak degradacji białka jedwabiu (ryc. 35A).

Rozdział elektroforetyczny wykazał, że białka MS1 i MS2 migrują na wysokości prążków markera mas, odpowiednio 40 i 60 kDa. Wysokość migracji białka MS1 była zgodna z teoretyczną masą cząsteczkową (39,54 kDa), natomiast wysokość migracji białka MS2 różniła się od teoretycznej masy cząsteczkowej (46,72 kDa). Analiza masy białka MS2 za pomocą spektrometrii masowej MALDI-TOF, potwierdziła teoretyczną masę cząsteczkową tego białka (ryc.35 B).

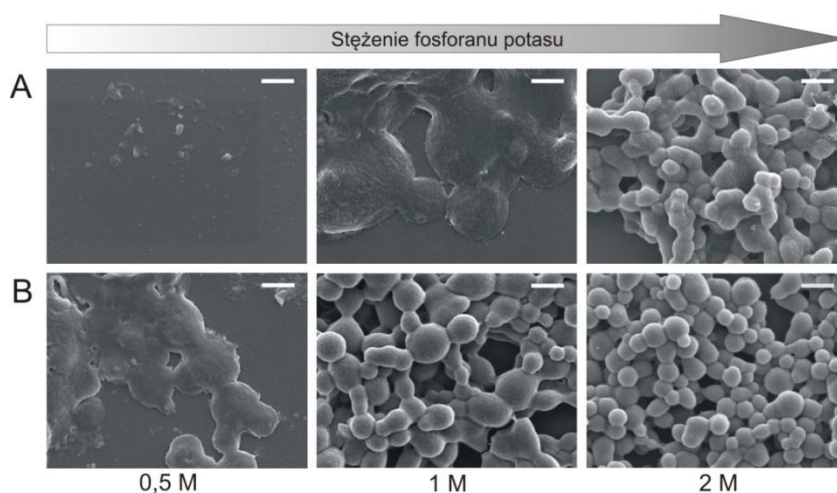


Rycina 35. Analiza białek MS1 i MS2 otrzymanych w procesie oczyszczania metodą 80/20. A) Rozdział elektroforetyczny białek 1- MS1 oraz 2 - MS2 w 12,5% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) w obecności markera masy białek Novex Sharp (NOVEX) – M; B) Analiza masy cząsteczkowej białka MS2 za pomocą spektrometrii masowej (MALDI-TOF).

4.4.2 Analiza morfologii sfer MS1 i MS2

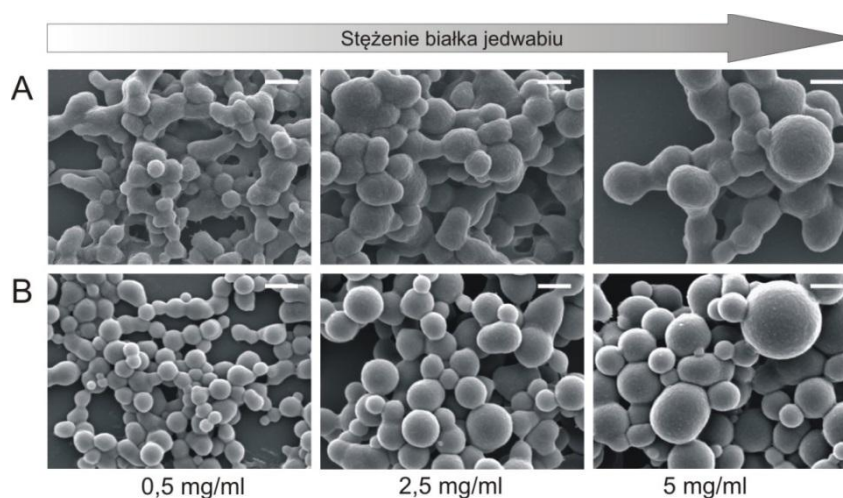
Białka MS1 i MS2 formowały sfery w wyniku mieszania z fosforanem potasu (ryc. 36 – 38). Morfologia sfer różniła się pomiędzy białkami. Białko MS1 formowało sfery o mniej kulistym kształcie, mające tendencję do zlepiania się i tworzenia agregatów. Białko MS2 tworzyło natomiast regularne, kuliste sfery. Oba rodzaje sfer miały gładką powierzchnię (ryc. 36 – 38).

Sfery wytworzono mieszając białka jedwabiu z fosforanem potasu o stężeniach 0,5, 1 i 2M. Białko MS2 formowało sfery w niższych stężeniach fosforanu potasu niż białko MS1. Z białka MS1 nie uzyskano sfer stosując 0,5 M fosforan potasu, natomiast 1M fosforan potasu indukował powstanie amorficznych agregatów. Sferyczne struktury z białka MS1 uzyskano stosując 2 M fosforan potasu (ryc. 36 A). Białko MS2 formowało agregaty w 0,5 M fosforanie potasu, natomiast powyżej stężenia 1M tworzyło stabilne, kuliste sfery (ryc. 36 B).



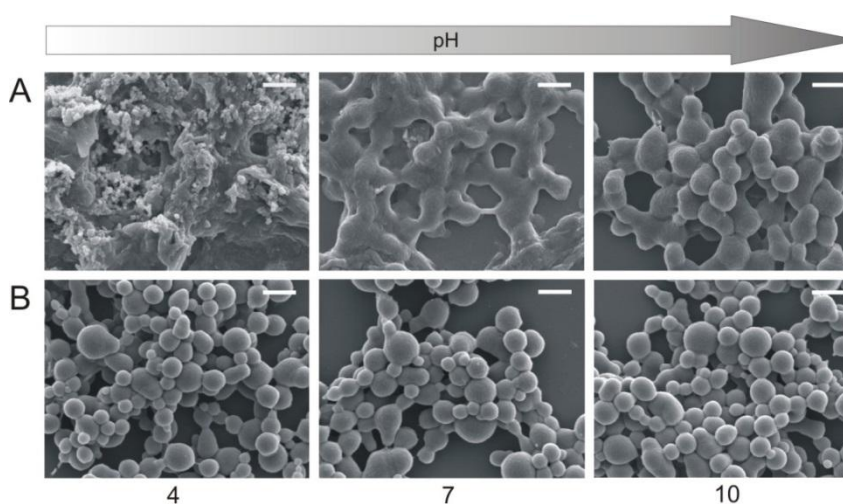
Rycina 36. Mikrofotografie sfer formowanych z białka A) MS1 oraz B) MS2 o początkowym stężeniu 0,5 mg/ml w 0,5, 1 i 2 M fosforanie potasu pH 8, Skala: 1 μ m.

Wraz ze wzrostem stężenia obu białek jedwabiu wzrastał rozmiar otrzymywanych sfer. Zastosowanie różnych stężeń białek nie miało wpływu na morfologię sfer (ryc. 37).



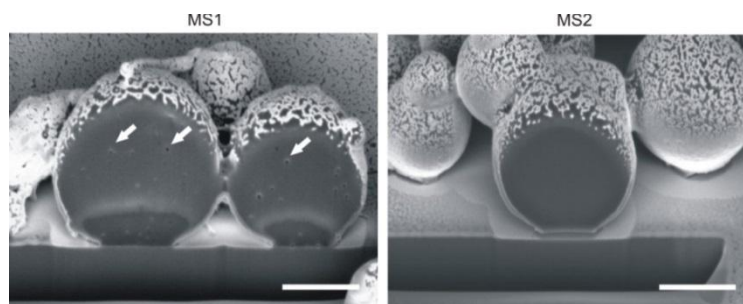
Rycina 37. Mikrofotografie sfer wytwarzanych z białek A) MS1 oraz B) MS2 o początkowych stężeniach 0,5, 2,5 oraz 5 mg/ml za pomocą wysalania 2M fosforanem potasu pH 8. Skala: 1 µm.

Morfologia sfer MS1 zmieniała się w zależności od pH buforu fosforanowego użytego do ich wytwarzania (ryc. 38). W pH 4 otrzymano amorficzne agregaty. W pH 7 sfery wykazywały dużą skłonność do agregacji, natomiast sfery otrzymane w pH 10 miały kulisty kształt. pH fosforanu potasu nie miało wpływu na morfologię sfer MS2 (ryc. 38).



Rycina 38. Mikrofotografie sfer wytwarzanych z białka A) MS1 oraz B) MS2 o początkowym stężeniu 0,5 mg/ml w 1,75 M fosforanie potasu o pH 4, 7 oraz 10. Skala: 1 µm.

Analiza morfologii wnętrza sfer MS1 i MS2 poprzez trawienie skupioną wiązką jonów (FIB) wykazała pory znajdujące się we wnętrzu sfer MS1 oraz jednorodne wnętrza sfer MS2 (ryc. 39).

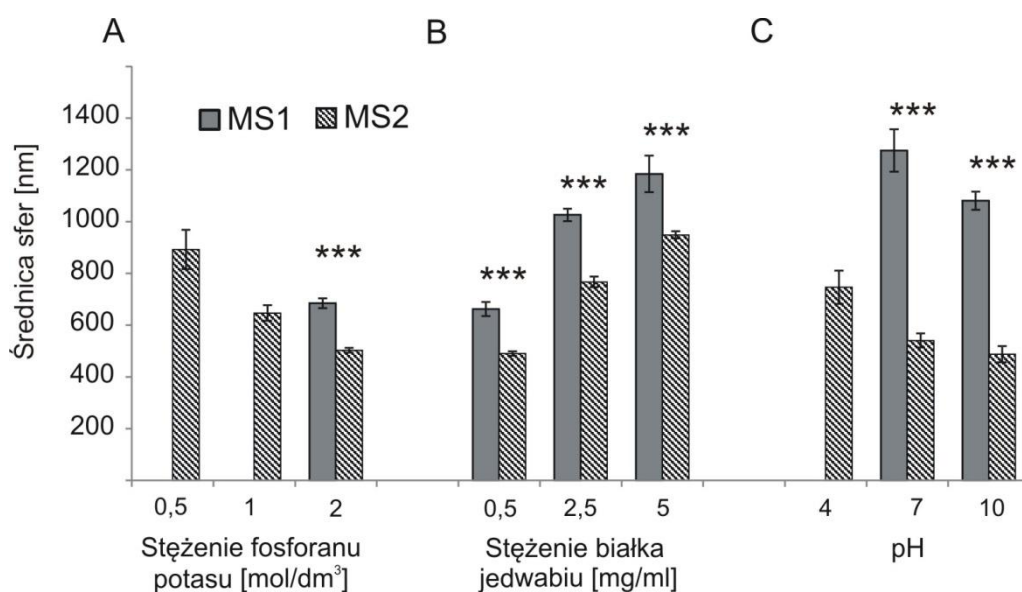


Rycina 39. Mikrofotografie sfer MS1 i MS2 wytrawianych skupioną wiązką jonów. Sfery wytwarzano za pomocą mieszania roztworu białka jedwabiu o stężeniu 5mg/ml z 2M fosforanem potasu pH 8. Strzałki wskazują pory we wnętrzu sfer MS1. Skala: 1 μ m.

4.4.3 Analiza rozmiaru sfer MS1 i MS2

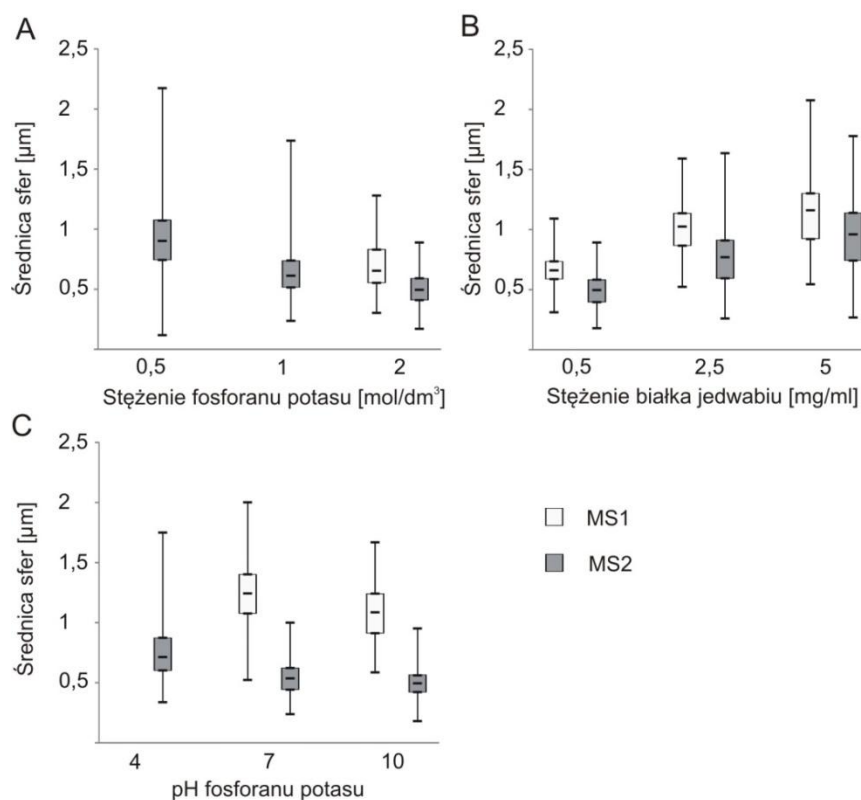
Sfery MS1 i MS2 istotnie różniły się wielkością niezależnie od warunków wytwarzania (ryc. 40). Sfery MS1 były średnio o 25% większe niż sfery MS2, za wyjątkiem sfer MS1 wytwarzanych w fosforanie o pH 7 i 10, które były dwa razy większe niż sfery MS2 (ryc.40).

Wraz ze wzrostem stężenia fosforanu zmniejszał się rozmiar sfer MS2 (ryc. 40 A), natomiast wraz ze wzrostem stężenia białka zwiększał się średni rozmiar obu rodzajów sfer (ryc. 40B). Najmniejsze sfery o średniej średnicy 490 nm i 660 nm, uzyskano odpowiednio dla białek MS1 i MS2 o stężeniu 0,5mg/ml mieszanych z 2M fosforanem potasu (ryc. 40B). Obserwowano nieznaczną redukcję rozmiaru sfer wytwarzanych w wyższym pH (ryc. 40C).



Rycina 40. Średnica sfer MS1 i MS2 uzyskana na podstawie pomiarów sfer z mikrofotografii SEM. Sfery formowane z A) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe od średniej wartości pomiarów z trzech eksperymentów. *** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.001$.

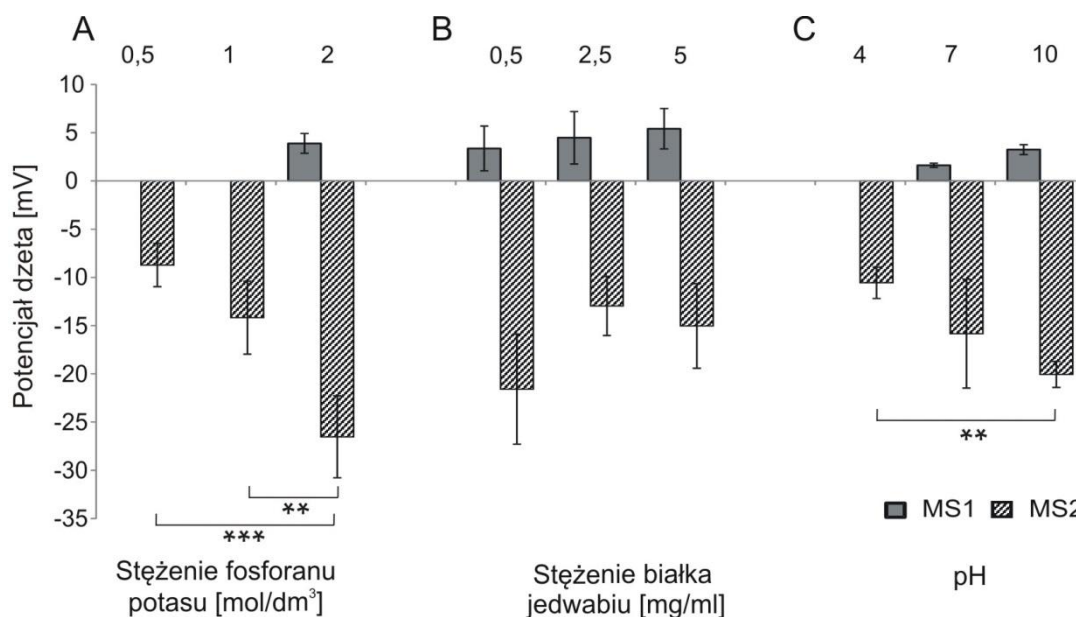
Pomimo istotnych różnic średniej wielkości średnicy sfer MS1 i MS2 (wytwarzanych przy różnych stężeniach białka jedwabiu oraz fosforanu potasu), zakres wielkości obu typów sfer był podobny (ryc. 41 A i B). Zaobserwowano szerszy zakres wielkości sfer MS1 wytwarzanych w fosforanie potasu o pH 7 i 10 (ryc. 14 C).



Rycina 41. Zakres wielkości sfer MS1 i MS2 na podstawie pomiarów średnicy. Sfery formowane z: A) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartył, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartył średnicy sfer. Linia wewnątrz pudełka oznacza medianę.

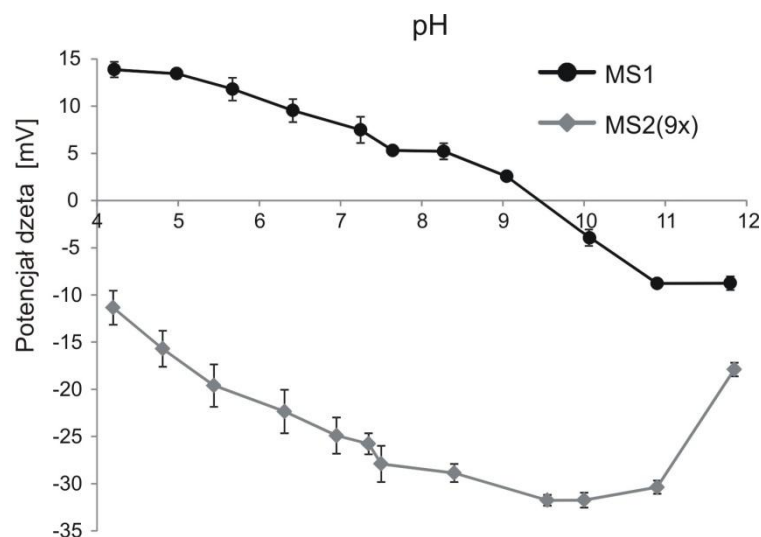
4.4.4 Analiza potencjału elektrokinetycznego sfer MS1 i MS2

W roztworze sfery MS1 wykazały dodatnie wartości potencjału elektrokinetycznego, a sfery MS2 – wartości ujemne. Potencjał dzeta sfer MS1 wynosił od 1,6 do 5,4 mV, natomiast sfery MS2 miały ujemny potencjał dzeta wynoszący od -8 mV do -28mV w zależności od warunków wytwarzania sfer (ryc. 42). Wraz ze wzrostem stężenia fosforanu potasu potencjał dzeta sfer MS2 istotnie się obniżał (z wartości -8,7 do -26,5 mV) (ryc. 42 A). Początkowe stężenie białek jedwabiu nie miało istotnego wpływu na potencjał elektrokinetyczny obu typów sfer (ryc. 42 B). Istotny spadek potencjału dzeta obserwowano w przypadku sfer MS2 wytwarzanych w wyższym pH, podczas gdy wyższe pH powodowało wzrost potencjału dzeta sfer MS1 (ryc. 42 C).



Rycina 42. Potencjał dzeta sfer MS1 i MS2 mierzony w zawiesinie wodnej w temp. 25°C. Sfery formowane z: A) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z fosforanem potasu, pH 8 o różnych stężeniach; B) białka jedwabiu o różnych stężeniach mieszane z 2M fosforanem potasu, pH 8, C) białka jedwabiu o stężeniu 0,5mg/ml mieszane z 2M fosforanem potasu o różnych pH. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości potencjału elektrokinetycznego. ** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$. Eksperyment wykonano trzykrotnie, w trzech powtórzeniach.

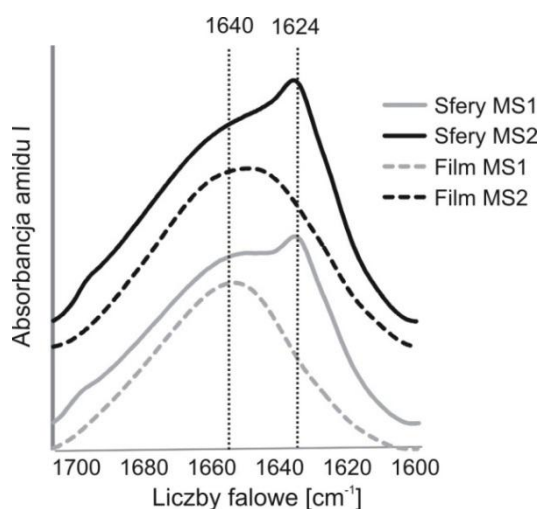
Dodatkowo przeprowadzono analizę potencjału elektrokinetycznego sfer MS1 oraz MS2 (na przykładzie białka MS2(9x) 80/20 posiadającego taki sam teoretyczny punkt izoelektryczny jak białko MS2) w roztworze wodnym o pH w zakresie od 4 do 12 (ryc. 43). Sfery MS1 posiadały dodatni ładunek w buforze o pH 4 do 9 natomiast w i powyżej pH 10, wykazały ujemny potencjał dzeta. Sfery MS2(9x) wykazały negatywny potencjał elektrokinetyczny w całym analizowanym zakresie pH. Wartość potencjału wzrastała wraz z obniżaniem się pH z 9 do 4, oraz wraz ze wzrostem pH z 10 do 12 (ryc.43).



Rycina 43. Potencjał dzeta sfer MS1 oraz MS2(9x) 80/20 w zakresie pH 4 -12. Sfery wytwarzano z białek jedwabiu (2,5 mg/ml) przy użyciu 2M fosforanu potasu pH 8. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe od średniej wartości potencjału elektrokinetycznego w danym pH. Eksperyment wykonano trzykrotnie.

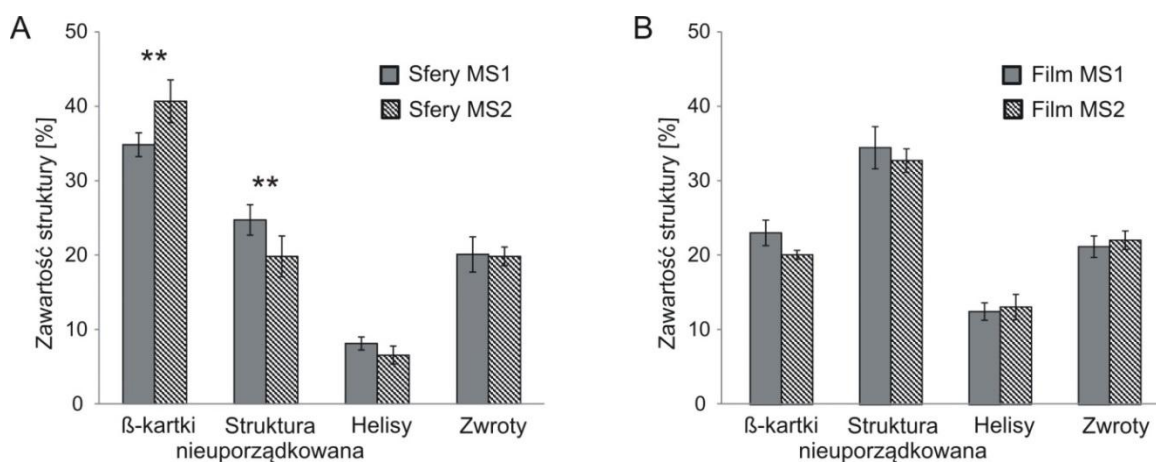
4.4.5 Analiza struktury drugorzędowej rozpuszczalnych białek oraz sfer

Zawartość struktur drugorzędowych w sferach MS1 i MS2 analizowano za pomocą spektroskopii podczerwieni (FTIR) (ryc. 44). Badano również widma absorpcji dla filmów powstałych w wyniku suszenia kropli roztworu rozpuszczalnych białek. Widma obydwu rodzajów sfer posiadały wyraźny pik na wysokości 1624 cm^{-1} odpowiadający strukturze β -kartki, natomiast w widmach filmów dominował pik 1640 cm^{-1} charakterystyczny dla struktury nieuporządkowanej (ryc. 44).



Rycina 44. Analiza pasm amidu I spektrów FTIR rozpuszczalnych filmów (linie przerywane) oraz sfer (linie ciągłe) z białek MS1 i MS2. Zaznaczono pasma odpowiadające: strukturze β -kartki - 1624 cm^{-1} oraz strukturze nieuporządkowanej łańcucha białkowego - 1640 cm^{-1} .

Zawartość poszczególnych struktur oszacowano na podstawie pasm amidu I poddanych dekonwolucji. Wyznaczono 11 pasm składowych posiadających maksima przy 1600, 1612, 1623, 1634, 1645, 1653, 1660, 1667, 1676, 1686 i 1697 cm^{-1} , które przyporządkowano poszczególnym strukturom drugorzędowym lub absorpcji łańcuchów bocznych. Wykazano różnice w zawartości β -kartki oraz struktur nieuporządkowanych pomiędzy sferami MS1 i MS2 (ryc. 45 A). Sfery MS1 posiadały $40\pm 1\%$ struktury β -kartki oraz $27\pm 3\%$ struktur nieuporządkowanych, podczas gdy dla sfer MS2 wartości te wynosiły odpowiednio $47\pm 4\%$ i $23\pm 3\%$. Filmy utworzone z białek MS1 i MS2 wykazały niższą zawartość β -kartek niż sfery, odpowiednio $25\pm 1\%$ i $23\pm 1\%$ oraz większą zawartość struktur nieuporządkowanych, odpowiednio $25\pm 2\%$ i $20\pm 3\%$. Nie zaobserwowano istotnych różnic w zawartości struktur drugorzędowych pomiędzy filmami MS1 i MS2 (ryc. 45 B).



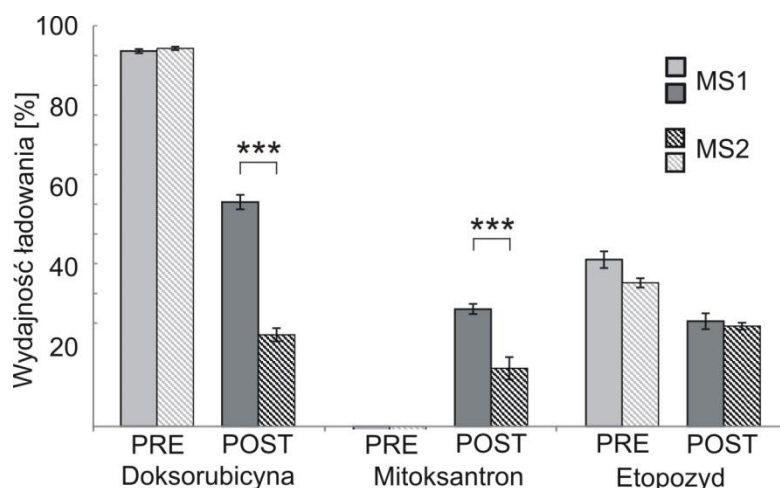
Rycina 45 Procentowa zawartość struktur drugorzędowych na podstawie analizy sfer oraz filmów formowanych z białek MS1 i MS2 w spektroskopii FTIR. Procentowa zawartość struktur drugorzędowych A) w sferach MS1 i MS2; B) w filmach utworzonych przez rozpuszczalne białka MS1 i MS2. Sfery wytwarzano z białka jedwabiu (5 mg/ml) przy użyciu 2M fosforanu potasu pH 8. Filmy powstały na skutek wyschnięcia kropli roztworu rozpuszczalnych białek jedwabiu. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe od średniej zawartości danej struktury na podstawie trzech niezależnych pomiarów. ** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.01$

4.4.6 Inkorporacja chemioterapeutyków do sfer MS1 i MS2

Do sfer MS1 i MS2 ładowano trzy leki przeciwnowotworowe: dokсорubicyna, mitoksantron oraz etopozyd. Chemioterapeutyki inkorporowano za pomocą dwóch metod: ładowania leku w trakcie wytwarzania sfer (metoda PRE) oraz ładowania leku po uformowaniu się sfer (metoda POST).

Stosując metodę PRE nie obserwowano różnic między wydajnością ładowania chemioterapeutyków do sfer MS1 i MS2 (ryc. 46). Dokсорubicynę załadowano w $94 \pm 1\%$ do obu typów sfer, a etopozyd w $42 \pm 2\%$ i $36 \pm 1\%$ odpowiednio do sfer MS1 i MS2. Wartości te odpowiadały $94 \mu\text{g}$ dokсорubicyny na 1 mg sfer oraz 42 i 36 μg etopozydu na 1mg sfer. Za pomocą strategii ładowania PRE mitoksantron nie został załadowany do sfer MS1 ani MS2 (ryc. 46).

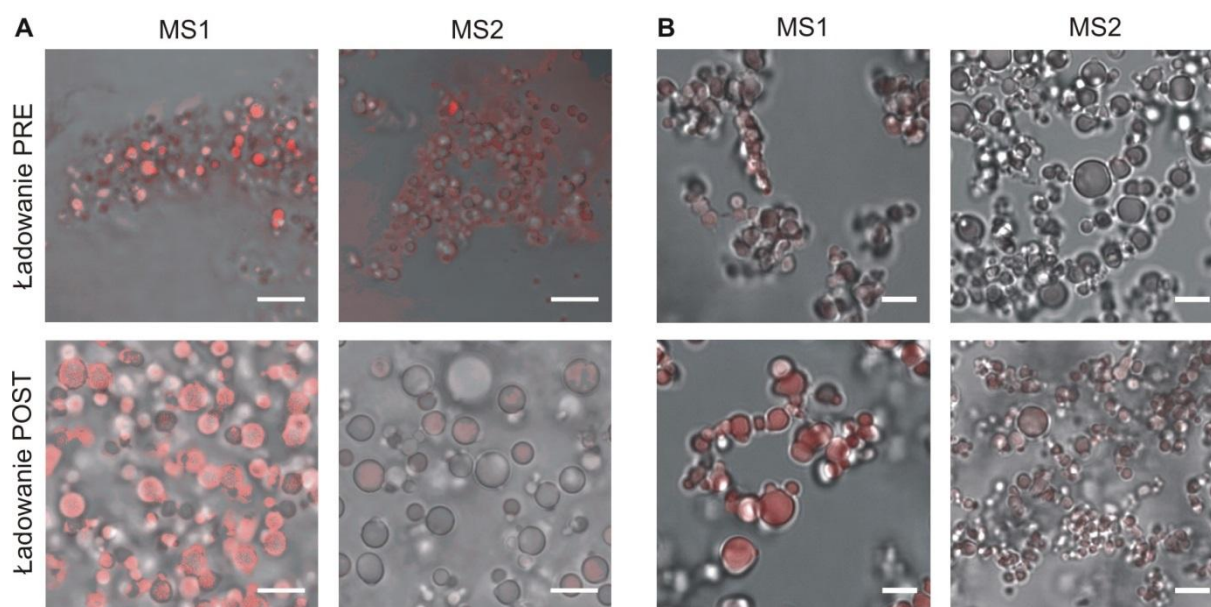
Stosując metodę POST, wydajność ładowania dokсорubicyny i mitoksantronu istotnie różniła się pomiędzy sferami MS1 i MS2. Dokсорubicynę oraz mitoksantron załadowano ze średnio dwukrotnie większą wydajnością do sfer MS1. 1 mg sfer MS1 i MS2 inkorporował odpowiednio 56 i 23 μg dokсорubicyny oraz 29 i 15 μg mitoksantronu. Nie obserwowano różnic w wydajności ładowania etopozydu do obu typów sfer (ryc.46).



Rycina 46. Wydajność ładowania chemioterapeutyków do sfer MS1 i MS2 za pomocą metod PRE i POST. W metodzie PRE 100 μg leku dodano do 1mg rozpuszczalnego białka i wytwarzano sfery poprzez mieszanie z 2M fosforanem potasu pH 8. W metodzie POST 100 μg leku dodano do 1mg sfer utworzonych uprzednio z białka o stężeniu 2,5mg/ml przy użyciu 2M fosforanu potasu pH 8. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości wydajności ładowania. Eksperyment wykonano trzykrotnie, w trzech powtórzeniach. *** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.001$

Chemioterapeutyki posiadające właściwości fluorescencyjne: dokсорubicynę i etopozyd analizowano po inkorporacji do sfer przy użyciu mikroskopu konfokalnego (ryc. 47). Sygnał fluorescencji dokсорubicyny był obecny we wnętrzu sfer MS1 ładowanych obiema metodami (ryc. 47 A). W przypadku sfer MS2 fluorescencję tego leku obserwowano jedynie na powierzchni sfer ładowanych metodą PRE, co w mikroskopie skaningowym było widoczne jako czerwona obwódka wokół sfer. We wnętrzu sfer MS2 ładowanych metodą PRE nie było sygnału fluorescencji dokсорubicyny.

Fluorescencję mitoksantronu wykazano w sferach MS1 w próbie ładowanej metoda PRE i we wnętrzu sfer ładowanych metodą POST (ryc. 47 B). Sfery MS2 ładowane metoda PRE nie wykazywały fluorescencji mitoksantronu, a ładowane metodą POST wykazywały słaby sygnał (ryc. 47 B).

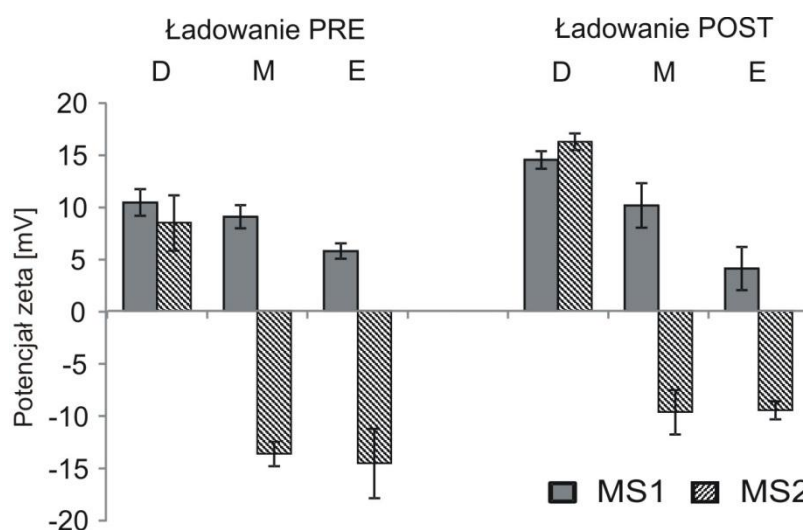


Rycina 47. Sfery MS1 i MS2 ładowane A) dokсорubicyną oraz B) mitoksantronem przy użyciu metod ładowania PRE oraz POST. Sfery obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego w białym świetle przechodzącym, fluorescencję leków obrazowano przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/590 dla dokсорubicyny oraz 607/684 dla mitoksantronu. Skala: 5 μm .

Ponadto, badano potencjał elektrokinetyczny sfer ładowanych lekami (ryc. 48). Sfery MS1 i MS2 ładowane dokсорubicyną wykazały dodatni potencjał dzeta: odpowiednio 8 ± 2 i 11 ± 2 mV w metodzie ładowania PRE i odpowiednio 14 ± 1 i 16 ± 1 mV w metodzie ładowania POST (ryc.48). Sfery MS2, wykazujące negatywny potencjał dzeta (ryc. 42), w wyniku inkorporacji dokсорubicyny (metodą PRE i POST) zmieniły swój ładunek na dodatni (ryc. 48).

Potencjał dzeta sfer MS1 i MS2 po inkorporacji mitoksantronu wynosił odpowiednio 9 ± 1 i -13 ± 1 mV w metodzie PRE oraz, odpowiednio 10 ± 2 i -10 ± 2 mV w metodzie POST (ryc. 48). W porównaniu do sfer nieładowanych lekiem (ryc. 42) potencjał dzeta sfer MS2 ładowanych mitoksantronem wzrósł, a w przypadku sfer MS1 nie zmienił się.

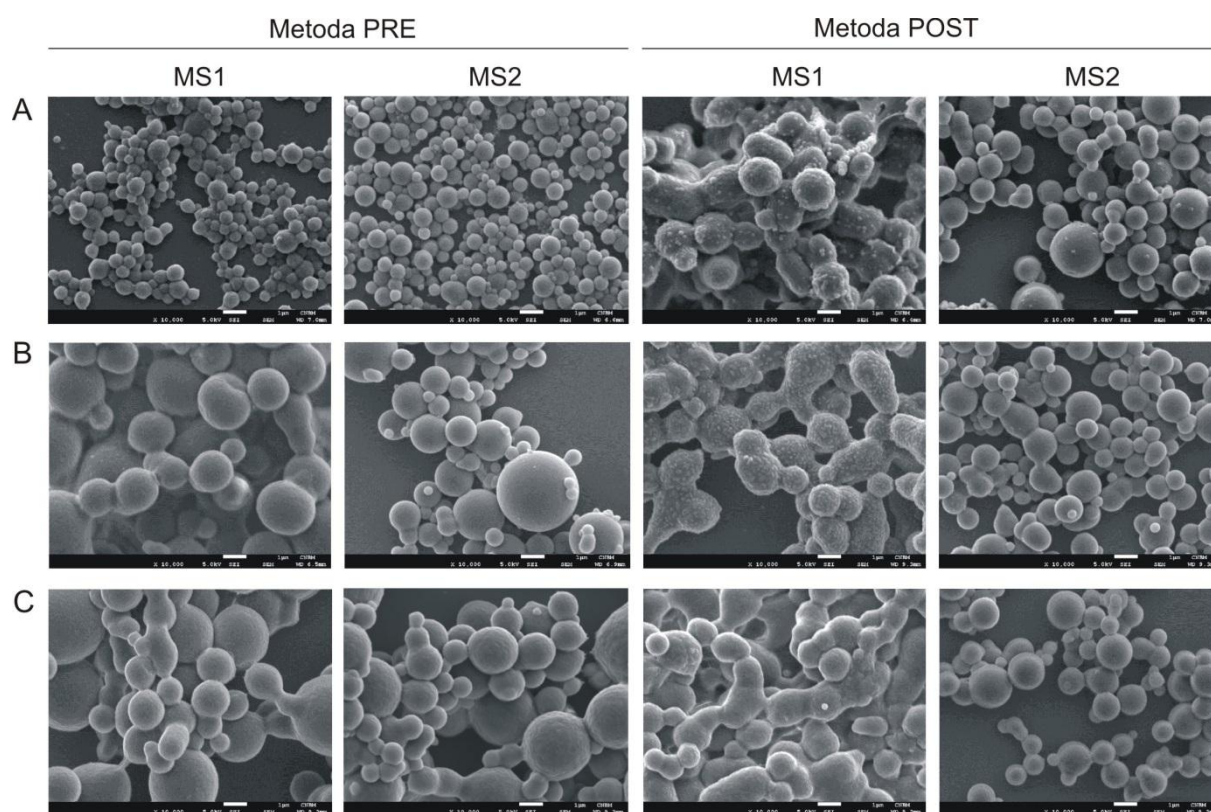
Potencjał dzeta sfer MS1 i MS2 po inkorporacji etopozydu wynosił odpowiednio 6 ± 1 i -15 ± 3 mV w metodzie PRE oraz, odpowiednio 4 ± 2 i -9 ± 1 mV w metodzie POST (ryc. 48). Zaobserwowano redukcję potencjału dzeta sfer MS1 ładowanych metodą POST, w stosunku do sfer nieładowanych (ryc. 42).



Rycina 48. Potencjał dzeta sfer MS1 i MS2 po ładowaniu leków dwiema metodami: PRE oraz POST. D – dokсорubicyna, M – mitoksantron, E – etopozyd. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości potencjału elektrokinetycznego. Eksperyment wykonano trzykrotnie.

Ładowanie leku metodą PRE zmieniło morfologię jedwabnych sfer. Sfery MS1 i MS2 ładowane dokсорubicyną przy użyciu metody PRE wykazały mały rozmiar oraz kulisty kształt (ryc. 49 A). Były one mniejsze w porównaniu do sfer ładowanych mitoksantronem lub etopozydem za pomocą tej samej metody (ryc. 49). Sfery MS1 ładowane dokсорubicyną, mitoksantronem oraz etopozydem przy użyciu metody PRE wykazywały poprawę morfologii – były bardziej kuliste i wykazywały mniejszą tendencję do agregacji (ryc. 49) niż sfery nieładowane lekiem (ryc. 37).

Ładowanie leku metodą POST nie wpłynęło na morfologię ani rozmiar sfer MS1 i MS2 (ryc. 49) w porównaniu do sfer nieładowanych lekiem (ryc. 37- 2,5 mg/ml). Sfery ładowane dokсорubicyną oraz mitoksantronem przy użyciu metody POST były pokryte ziarnistościami (ryc. 49 A i B).



Rycina 49. Mikrofotografie sfer MS1 i MS2 ładowanych lekami przeciwnowotworowymi (A) dokсорubicyną, (B) mitoksantronem oraz (C) etopozydem za pomocą metod PRE i POST. Sfery ładowane lekami przy użyciu metody PRE wytwarzane były przy stężeniu białka 7,6 mg/ml. Sfery ładowane lekami przy użyciu metody POST wytwarzane były przy stężeniu białka 2,5 mg/ml. Skala 1 μm .

4.4.7 Profile uwalniania chemioterapeutyków ze sfer MS1 i MS2

Sfery MS1 i MS2 ładowanie lekami przy użyciu metod ładowania PRE i POST poddano inkubacji w buforze fosforanowym (PBS) w temp 37°C w celu analizy kinetyki uwalniania badanych leków. Dokсорubicynę, mitoksantron i etopozyd uwalniano w PBS, pH 7,4 przez 48 godzin. Pomiaru stężenia uwolnionego leku w buforze mierzono w ustalonych punktach czasowych.

4.4.7.1 Uwalnianie ze sfer ładowanych metodą PRE

Kinetyka uwalniania dokсорubicyny była podobna dla obu typów sfer ładowanych metodą PRE. Sfery MS1 i MS2 inkorporowane dokсорubicyną przy użyciu metody PRE uwolniły w przeciągu pierwszej godziny odpowiednio 36 i 39% ładowanego leku, co stanowiło odpowiednio 34 i 37 µg. Po 48 godzinach sfery MS1 uwolniły 55 µg, a sfery MS2 60 µg dokсорubicyny, co stanowiło odpowiednio 59 i 64% początkowej ilości załadowanego do sfer leku (ryc. 50 A).

Przy użyciu metody PRE nie obserwowano inkorporacji mitoksantronu do obu typów sfer.

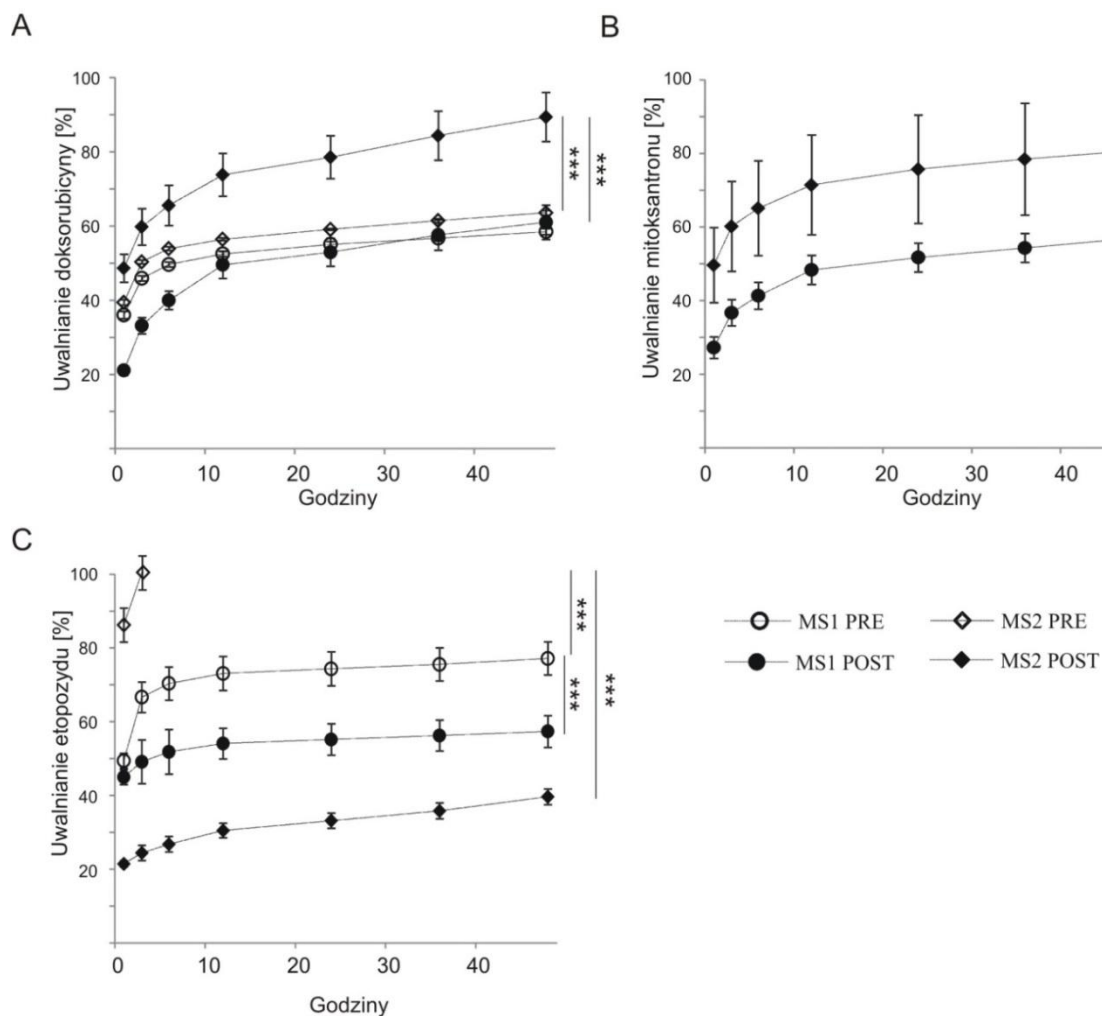
Etopozyd uwolnił się w pierwszej godzinie w 49 i 86 % (20 i 30 µg) odpowiednio ze sfer MS1 i MS2. Po 48 godzinach lek ten został uwolniony w 77% (32 µg) ze sfer MS1 oraz całkowicie (czyli 100% - 36 µg) ze sfer MS2 już po 3 godzinach (ryc. 50 C).

4.4.7.2 Uwalnianie ze sfer ładowanych metodą POST

W pierwszej godzinie uwalniania sfery MS1 i MS2 ładowane przy użyciu metody POST uwolniły podobną ilość dokсорubicyny (11,7 i 11µg) co stanowiło odpowiednio 21 i 49% załadowanego leku. W ciągu 48 godzin ze sfer MS1 uwolniło się średnio 61% (34 µg) leku, natomiast sfery MS2 uwalniały 89% (20 µg) inkorporowanej dokсорubicyny (ryc. 50 A).

W pierwszej godzinie uwalniania, ze sfer MS1 i MS2 ładowanych mitoksantronem metodą POST zostało uwolnione odpowiednio 8 i 7 µg tego leku co stanowiło 29 i 50% ilości początkowej (wynoszącej odpowiednio 29 i 14 µg na 1 mg sfer). Po 48 godzinach ze sfer MS1 uwolniło się 57±4% (17 µg) zainkorporowanego leku, podczas gdy sfery MS2 uwolniły 81±16% załadowanego mitoksantronu (ryc. 50B).

Sfery MS1 i MS2 załadowane etopozydem przy użyciu metody POST uwolniły w pierwszej godzinie odpowiednio 34 i 24% leku z początkowo załadowanej ilości 25 i 26 μg . Po 48 godzinach sfery MS1 i MS2 uwolniły odpowiednio 51 i 40% tego leku.

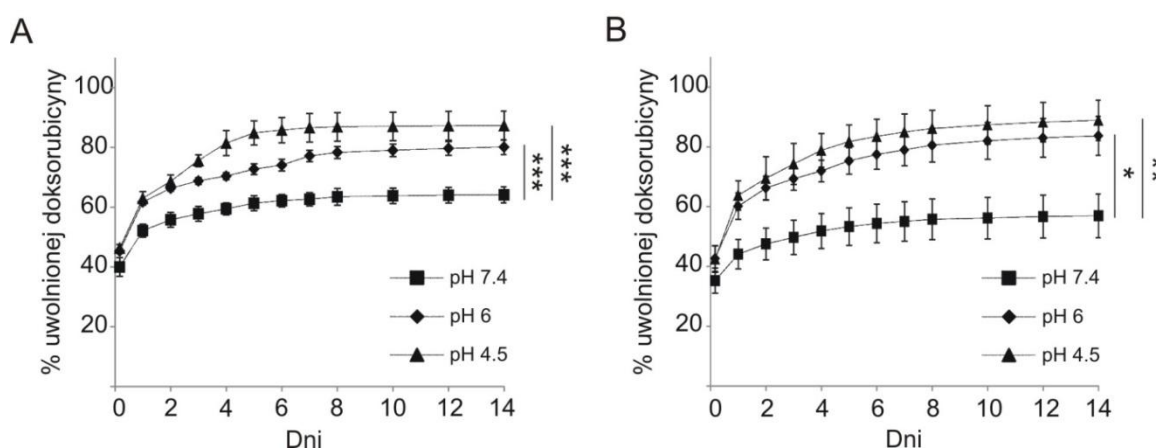


Rycina 50. Skumulowane uwalnianie leków: A) doxorubicyny, B) mitoksantronu oraz C) etopozydu ładowanych metodami PRE i POST ze sfer MS1 i MS2 z 1 mg sfer przez 48 godzin w buforze PBS pH 7,4 w temp. 37 C. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości procentowej uwolnionego leku. Eksperyment wykonano trzykrotnie. ** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

4.4.7.3 Uwalnianie dokсорubicyny zależne od pH

Uwalnianie dokсорubicyny badano przez okres 14 dni w buforach fosforanowych o różnych wartościach pH. Do uwalniania stosowano PBS o pH 7,4 – odpowiadający wartości pH cytoplazmy, PBS o pH 6 – odpowiadający pH endosomów oraz pH 4,5 – odpowiadający pH lizosomów.

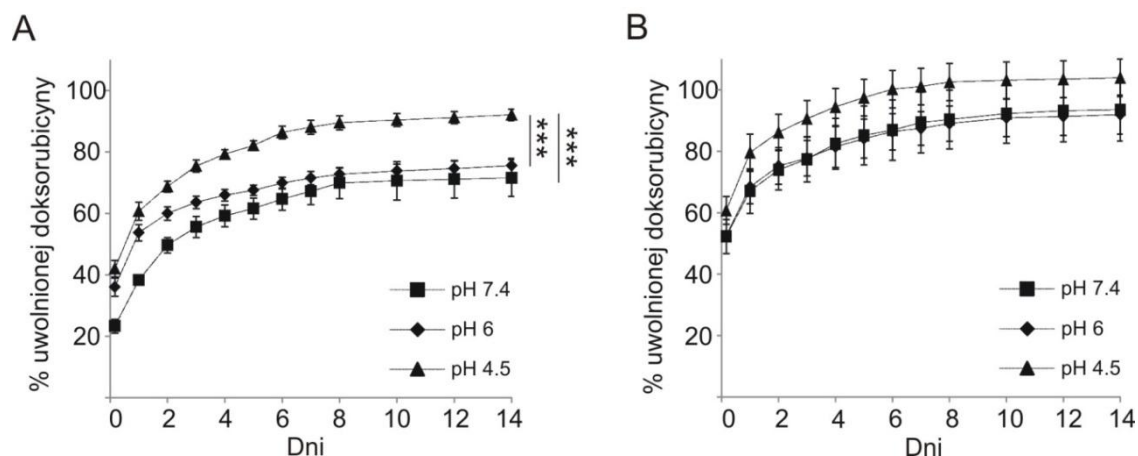
Niższe pH buforu powodowało zwiększone uwalnianie dokсорubicyny niezależnie od typu sfer oraz od zastosowanej metody ładowania (ryc. 51 i 52). Po 14 dniach dokсорubicyna uwalniana była ze sfer MS1 w pH 7,4, 6 i 4,5 w, odpowiednio 64 ± 3 , 80 ± 2 i $87\pm 5\%$ początkowo załadowanego leku (91 i 93 μg na 1 mg sfer, odpowiednio MS1 i MS2) (ryc. 51A). W tym samym czasie sfery MS2 uwolniły 57 ± 7 , 84 ± 6 i $89\pm 7\%$ dokсорubicyny w buforach o pH odpowiednio 7,4, 6 i 4,5 (ryc. 52B).



Rycina 51. Skumulowane uwalnianie dokсорubicyny ładowanej metodą PRE ze sfer A) MS1 i B) MS2 z 1 mg sfer przez 14 dni w buforach PBS o pH 7,4, pH 6 i pH 4,5 w temp. 37 C. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości procentowej uwolnionego leku. Eksperyment wykonano trzykrotnie. * oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

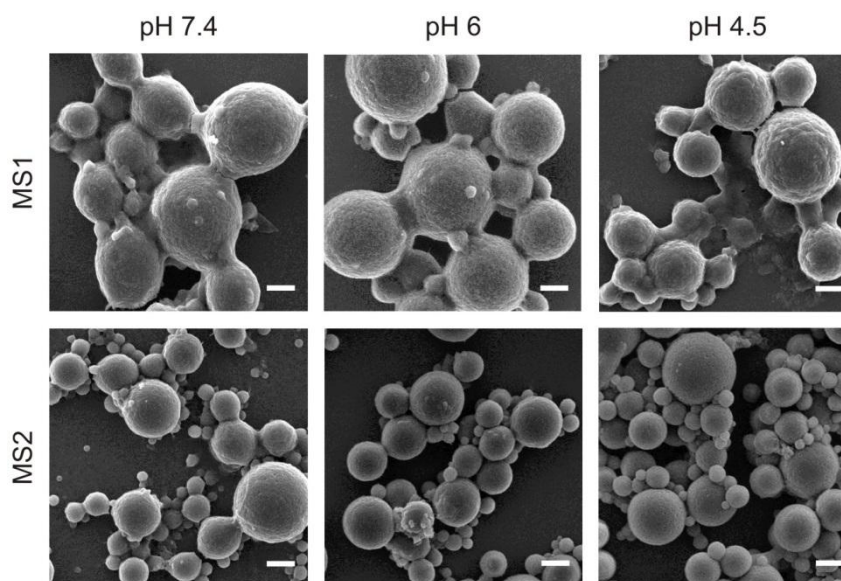
W ciągu 14 dni, dokсорubicyna ładowaną do sfer MS1 i MS2 przy użyciu metody POST uwolniła się ze sfer MS1 w 72 ± 6 , 74 ± 2 oraz $92\pm 2\%$, odpowiednio w buforach o pH 7,4, 6 i 4,5 (co stanowiło 44, 42 i 56 μg z początkowo załadowanych 62 μg) (ryc. 52A).

Po 14 dniach uwalniania w buforach o pH 7,4, 6 i 4,5 ze sfer MS2 została uwolniona całość załadowanej dokсорubicyny (odpowiednio 94 ± 10 , 92 ± 6 oraz $100\pm 6\%$ z 20 μg początkowo załadowanej dokсорubicyny) (ryc. 52B).



Rycina 52. Skumulowane uwalnianie doksorubicyny ładowanej metodą POST ze sfer A) MS1 i B) MS2 z 1 mg sfer przez 14 dni w buforach PBS o pH 7,4, pH 6 i pH 4,5 w temp. 37 C. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej wartości procentowej uwolnionego leku. Eksperyment wykonano trzykrotnie. * oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

Proces uwalniania leku przebiegający przez 14 dni w 37°C w buforach o pH 7,4, 6 oraz 4,5 nie spowodował degradacji ani utraty sferycznego kształtu sfer MS1 i MS2 (ryc. 53).



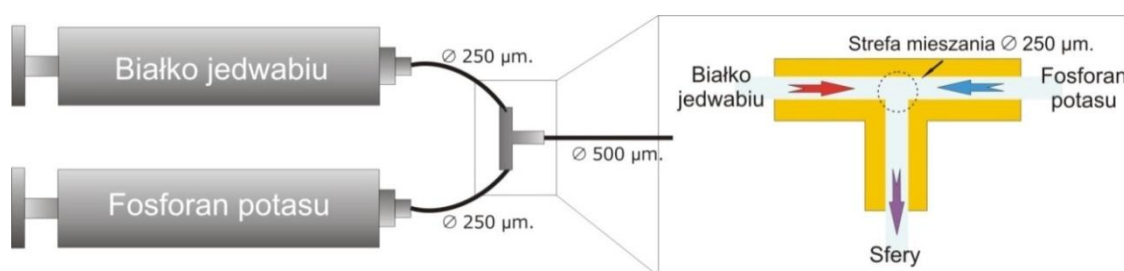
Rycina 53. Sfery MS1 i MS2 ładowane metodą POST po 14 dniach uwalniania doksorubicyny w buforach o pH 7,4, pH 6 i pH 4,5. Skala - 1µm.

4.5 Automatykacja produkcji jedwabnych nošników leku

W celu automatyzacji wytwarzania sfer ręczne mieszanie roztworu białka jedwabiu z fosforanem potasu za pomocą pipety testowano system mikromieszania przy użyciu wysokociśnieniowych pomp strzykawkowych. Pompy strzykawkowe zapewniają precyzyjną kontrolę nad parametrami wytwarzania sfer takimi jak: prędkość przepływu obu roztworów, ilość dozowanych roztworów oraz średnica strefy mieszania roztworu białka jedwabiu z fosforanem potasu. Kontrola wymienionych parametrów miała na celu uzyskanie sfer o określonej wielkości oraz o wąskim zakresie wielkości. Ponadto, zastosowanie pomp powinno zwiększyć skalę produkcji sfer w wystandaryzowanych warunkach wytwarzania.

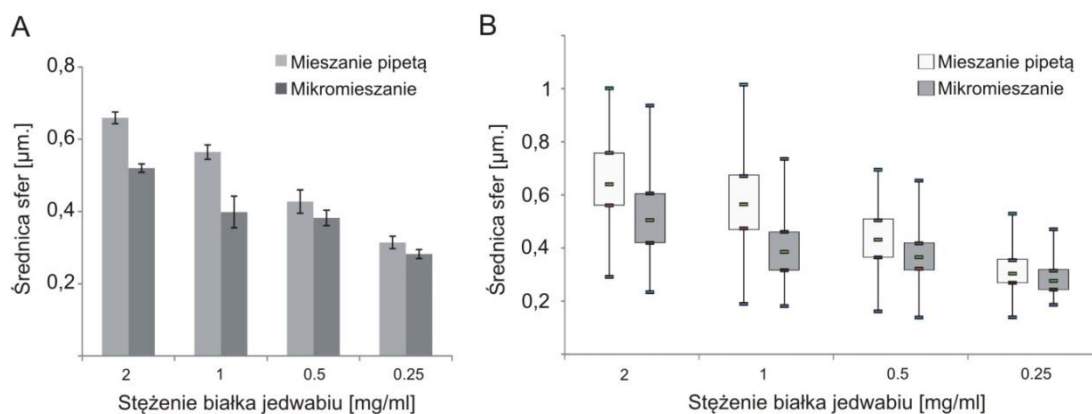
4.5.1 Optymalizacja produkcji sfer za pomocą pomp strzykawkowych

System zastosowany do wytwarzania sfer metodą mikromieszania przedstawiono na ryc. 54



Rycina 54. Schemat urządzenia stosowanego do wytwarzania sfer z jedwabiu pajęczego metodą mikromieszania. Stosowano dwie wysokociśnieniowe pompy strzykawkowe o kontrolowanej prędkości dozowania płynów. Strzykawki wypełnione białkiem jedwabiu oraz fosforanem potasu połączone wężykami oraz trójnikiem o wewnętrznej średnicy 250 µm. Średnica strefy mieszania dwóch roztworów wynosiła 250 µm.

W pierwszym etapie wielkość (średnicę) sfer MS2 otrzymanych w procesie mikromieszania porównano z rozmiarem sfer wytwarzanych za pomocą ręcznego mieszania przy użyciu pipety. Mikromieszanie przeprowadzono przy użyciu układu wężyków i trójnika przedstawionego na ryc. 54. Roztwór białka jedwabiu mieszano z fosforanem potasu stosując przepływy odpowiednio 10 µl/s i 100 µl/s. W każdym z badanych stężeń białka jedwabiu, sfery otrzymane w wyniku mikromieszania posiadały mniejszy średni rozmiar (ryc. 55A) oraz mniejszy zakres wielkości niż sfery produkowane przy użyciu pipety (ryc. 55 B).



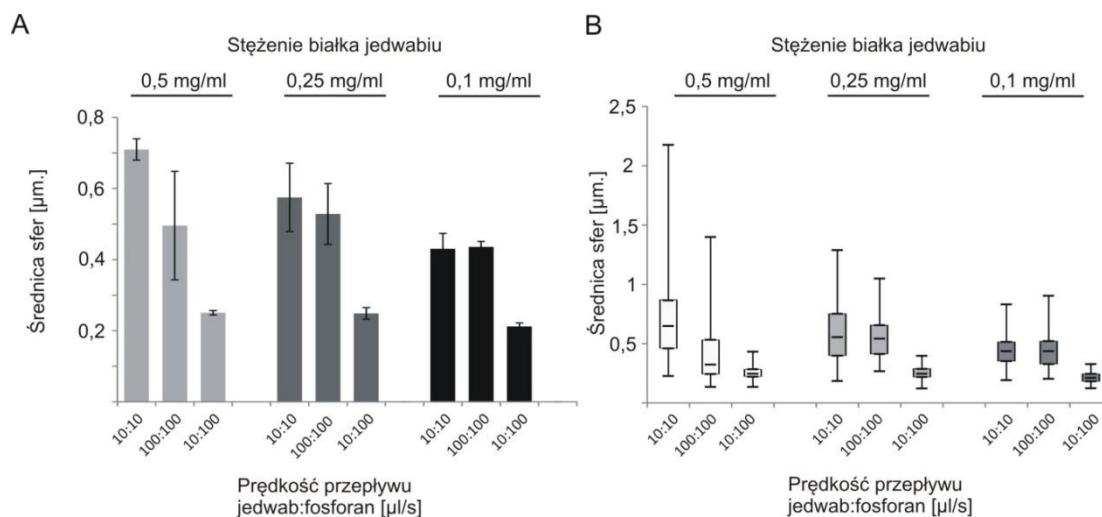
Rycina 55. Średnica oraz zakres wielkości sfer MS2 wytwarzanych z różnych stężeń białka jedwabiu przy użyciu 2M fosforanu potasu pH 8 za pomocą mieszania pipetą lub pomp strzykawkowych. (A) Średnia wartość średnicy sfer MS2 uzyskanych metodą ręcznego mieszania pipetą oraz mikromieszania. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej średnicy z trzech eksperymentów. (B) Rozrzut wielkości sfer na podstawie pomiarów średnicy. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartyl, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartyl średnicy sfer. Pionową linię wewnątrz pudełka zaznaczono medianę.

W następnych etapach optymalizowano warunki mikromieszania takie jak prędkość dozowania mieszanych roztworów, stosunek mieszania roztworów, stężenie białka jedwabiu oraz średnicę wężyków łączących pompy strzykawkowe i średnicę strefy mieszania.

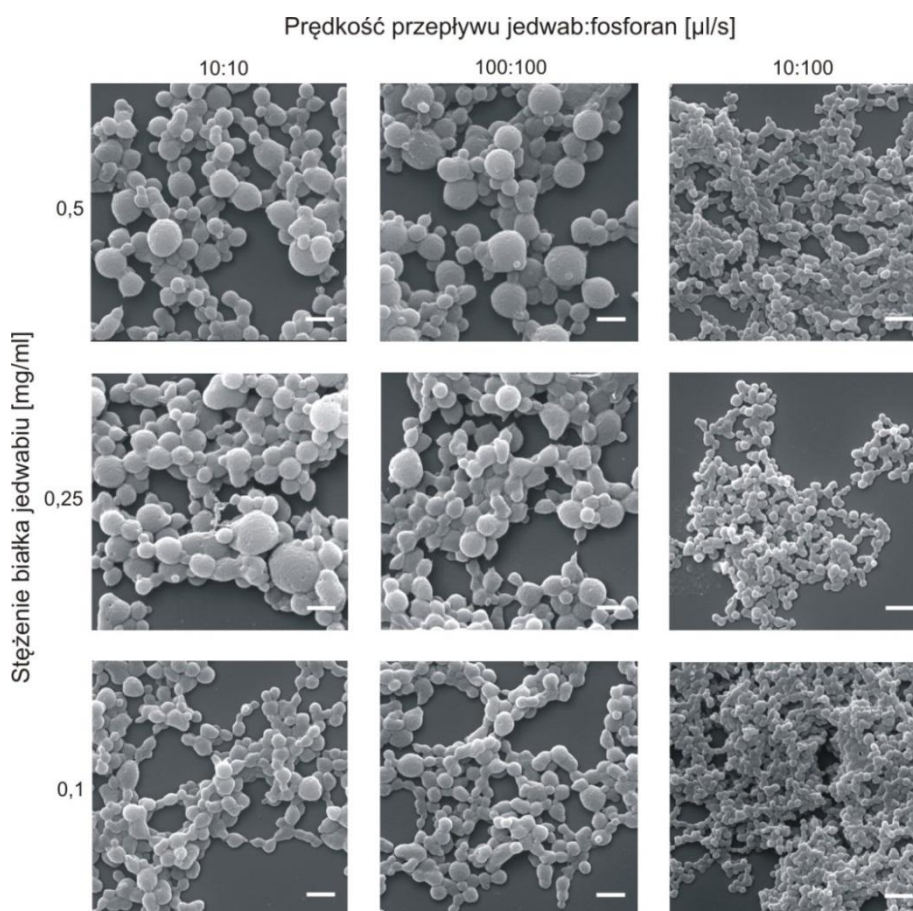
Roztwory jedwabiu oraz fosforanu mieszano w stosunku 1:1 stosując prędkości przepływu 10 μl/s: 10 μl/s lub 100 μl/s: 100 μl/s oraz w stosunku 1:10 przy prędkościach przepływu jedwab: fosforan - 10 μl/s: 100 μl/s.

Wielkość sfer uzyskanych za pomocą mikromieszania w stosunku 1:1 zmniejszała się wraz ze zmniejszającym się stężeniem białka jedwabiu (ryc. 56 A). Dodatkowo, średnica oraz rozrzut sfer otrzymanych w stosunku mieszania 1:1 były mniejsze przy większej prędkości mieszania dla stężeń białka 0,5 oraz 0,25 mg/ml.

Najmniejsze sfery o wąskim rozrzucie wielkości powstawały na skutek mikromieszania w stosunku 1:10 (ryc. 56 i 57). Nie zaobserwowano zmian średniej wielkości tych sfer w zależności od stężenia białka (ryc. 56 A)

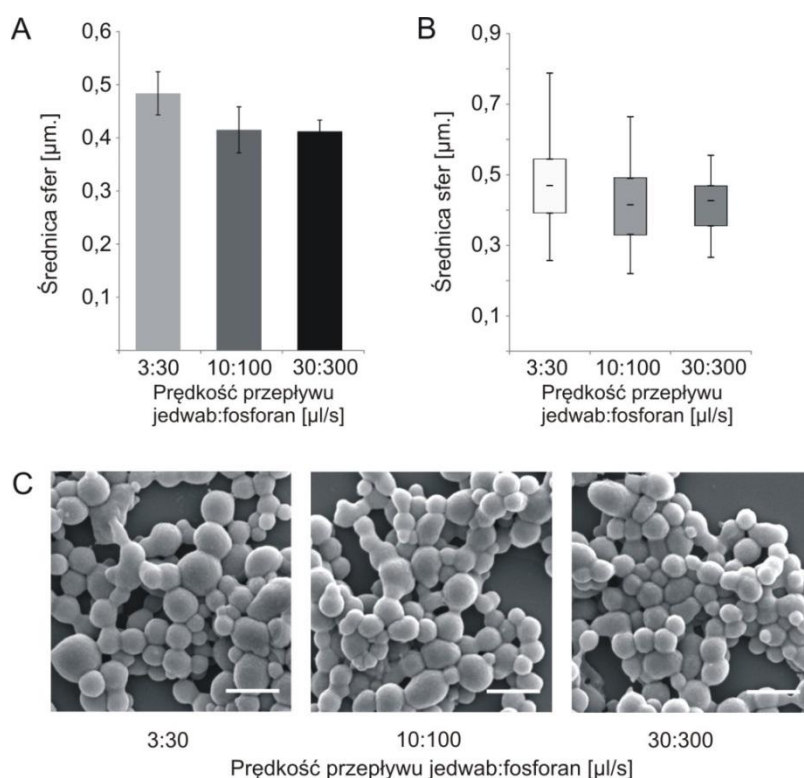


Rycina 56. Średnica oraz zakres wielkości sfer MS2 uzyskanych metodą mikromieszania przy zastosowaniu różnych prędkości przepływu roztworu białka jedwabiu oraz 2M fosforanu potasu pH 8 oraz różnych stężeń białka jedwabiu. A) Średnia wartość średnicy sfer MS2. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe z trzech eksperymentów. B) Zakres wielkości sfer na podstawie pomiarów średnicy. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartyl, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartyl średnicy sfer. Pionową linią wewnątrz pudełka zaznaczono medianę.



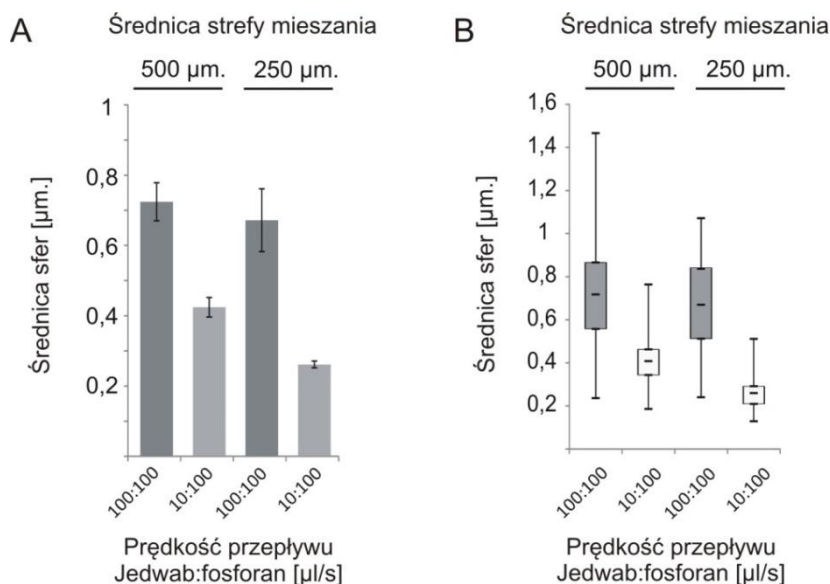
Rycina 57. Mikrografie sfer formowanych z białka MS2 o różnych stężeniach uzyskanych za pomocą mikromieszania. Stosowano różne prędkości przepływu i stosunki mieszania roztworu białka jedwabiu oraz 2M fosforanu potasu pH 8. Skala: 1μm.

Zwiększenie prędkości przepływu roztworów: białka jedwabiu oraz fosforanu potasu z 3:30 $\mu\text{l/s}$ do 10:100 $\mu\text{l/s}$ powodowała nieznaczne zmniejszenie średniej wielkości otrzymywanych sfer, jednak przy dalszym zwiększaniu prędkości przepływu nie obserwowano redukcji rozmiaru sfer (ryc. 58 A). Zwiększenie prędkości mieszania powodowało zmniejszenie zakresu wielkości otrzymywanych sfer (ryc. 58 B). Najmniejsze i najbardziej jednorodne sfery otrzymano przy prędkości mieszania 30: 300 $\mu\text{l/s}$ (ryc. 58).



Rycina 58. Sfery otrzymywane za pomocą mikromieszania białka jedwabiu MS2 (0,5 mg/ml) z 2M fosforanem potasu pH 8 w stosunku objętościowym 1:10 przy zastosowaniu różnych prędkości przepływu obu roztworów. (A) średnia średnica sfer w zależności od prędkości przepływu jedwabiu oraz fosforanu. Słupki błędów oznaczają odchylenie od średniej wielkości sfer z 3 eksperymentów; B) Rozrzut wielkości sfer na podstawie pomiarów średnicy. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartył, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartył średnicy sfer. Pionową linią wewnątrz pudełka zaznaczono medianę; C) mikrofotografie sfer MS2 otrzymanych za pomocą mikromieszania przy różnych prędkościach przepływu obu roztworów. Skala: 1 μm .

Następnie badano wpływ rozmiaru wężyków doprowadzających roztwory jedwabiu oraz fosforanu do trójnika oraz średnicy strefy mieszania. (Elementy te przedstawiono na ryc. 54). Zastosowanie wężyków oraz strefy mieszania o większej średnicy (500 μm) spowodowało wzrost średniego rozmiaru sfer (ryc. 59 A) oraz zwiększenie się zakresu wielkości otrzymywanych sfer MS2 (ryc. 59 B).

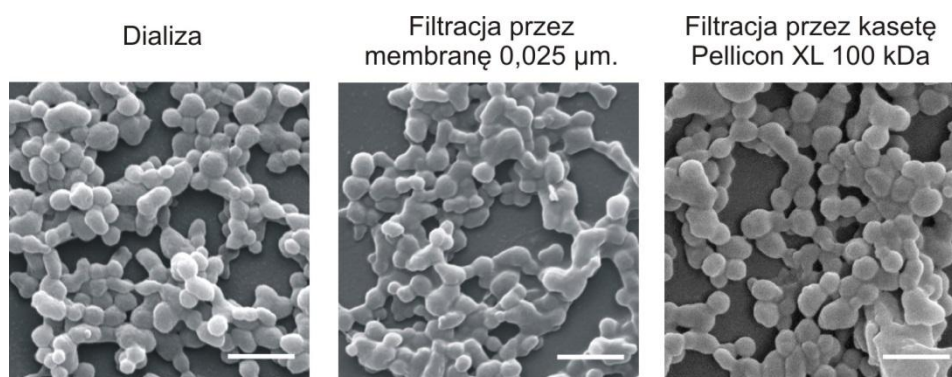


Rycina 59. Wpływ średnicy wężyków oraz strefy mieszania na średnicę i zakres wielkości sfer MS2. Sfery wytwarzano przy użyciu dwóch różnych rozmiarów wężyków i trójnika: 500 i 250 μm łączącego pompy strzykawkowe: o średnicy 500 i 250 μm i stosunkach mieszania 1 do 1 lub 1 do 10. Roztwór białka MS2 o stężeniu 0,25 mg/ml mieszano z 2M fosforanem potasu pH 8. A) Średnia wartość średnicy sfer MS2. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe z trzech eksperymentów. B) Rozrzut wielkości sfer na podstawie pomiarów średnicy. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartyl, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartyl średnicy sfer. Pionową linią wewnątrz pudełka zaznaczono medianę.

4.5.2 Filtracja i odzyskiwanie sfer

Standardową metodą pozyskiwania wodnej zawiesiny sfer, które bezpośrednio po procesie wytwarzania znajdują się w 2M roztworze fosforanu potasu była dializa do wody dejonizowanej. Znacznie zwiększone objętości zawiesiny sfer otrzymywanej podczas mikromieszania związanej z automatyzacją procesu, wymusiło opracowanie nowej metody oczyszczania sfer z roztworu soli fosforanowej. Testowano efektywność dwóch metod ultrafiltracji sfer: filtrację przy użyciu membrany o średnicy porów 0,025 μm pod ciśnieniem 2 bar oraz ultrafiltrację przy użyciu kasety Pellicon XL o punkcie odcięcia 100 kDa.

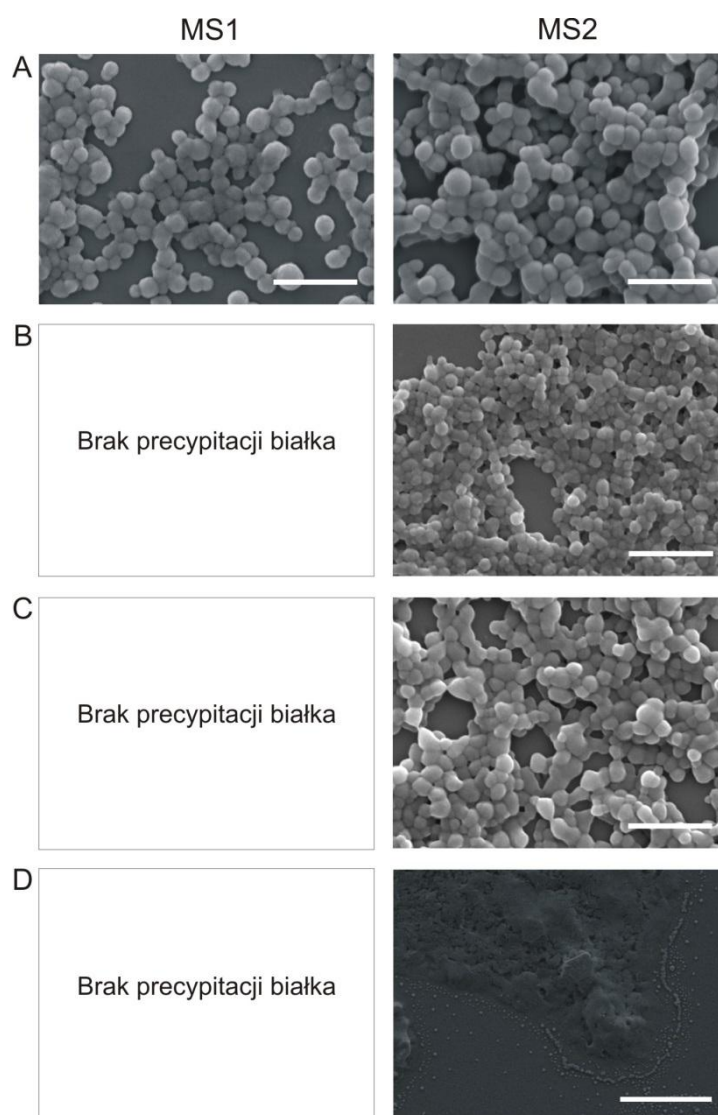
Sfery otrzymane po filtracji z użyciem membrany 0,025 μm wykazały większą tendencję do agregacji (ryc. 60). Morfologia sfer uzyskanych w procesie filtracji przy użyciu kasety Pellicon XL nie różniła się od sfer oczyszczanych poprzez dializę. Ponadto, metoda ultrafiltracji przez kasetę Pellicon XL nie wymagała użycia sprężonego powietrza oraz była też bardziej efektywna czasowo.



Rycina 60. Mikrofotografie sfer MS2 otrzymanych za pomocą mikromieszania, oczyszczanych różnymi metodami: za pomocą dializy, ultrafiltracji przez membranę 0,025 μm oraz ultrafiltracji przy użyciu kasety Pellicon XL o punkcie odcięcia 100 kDa. Skala 1 μm .

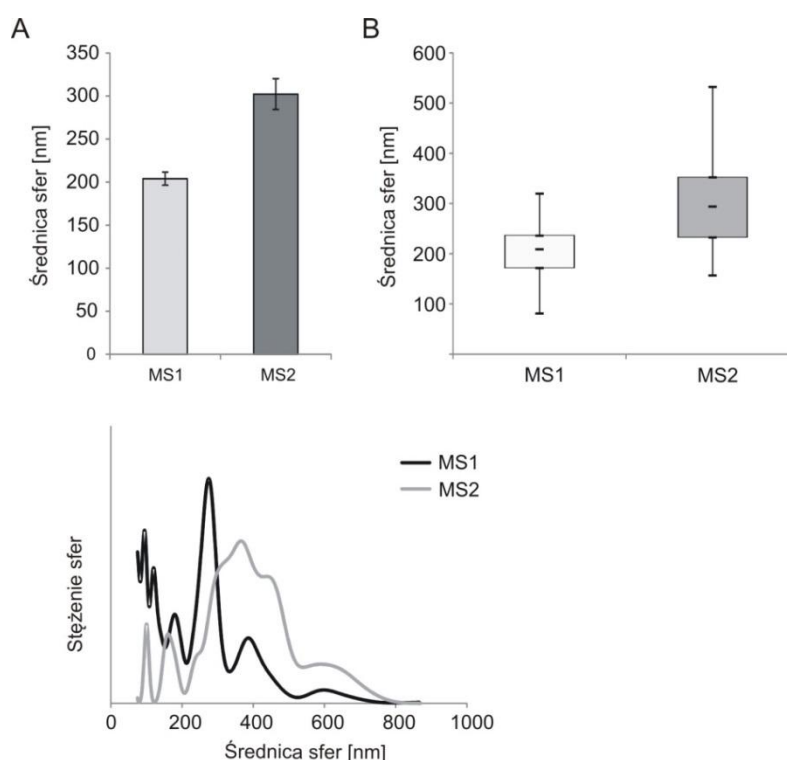
4.6 Wytwarzanie sfer z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych

Kolejnym etapem pracy było zastosowanie rozpuszczalników organicznych takich jak aceton, etanol, metanol oraz izopropanol do wytwarzania sfer metodą desolwatacji i analiza ich właściwości (ryc. 61). Sfery MS1 powstały jedynie pod wpływem mieszania roztworu tego białka z acetonem (ryc. 61 A). W badanych alkoholach nie następowało wytrącenie się białka MS1 z roztworu. Białko MS2 tworzyło kuliste sfery w acetonie, metanolu oraz etanolu. Za pomocą izopropanolu uzyskano sferycznych cząstek, jedynie amorficzne agregaty (ryc. 61 D).



Rycina 61. Mikrofotografie sfer z białka MS2 (2,5 mg/ml) wytwarzane w procesie koacerwacji w rozpuszczalnikach organicznych (A) acetonie, (B) metanolu, (C) etanolu i (D) izopropanolu. Skala: 1µm.\

Sfery otrzymane poprzez mieszanie z rozpuszczalnikami organicznymi charakteryzowały się mniejszym rozmiarem niż sfery otrzymywane za pomocą mieszania z fosforanem potasu (ryc. 61 A). W wyniku desolwatacji acetonem otrzymano sfery o średniej wielkości (średnicy) 204 nm i 302 nm odpowiednio przy użyciu białka MS1 i MS2. Sfery MS1 prezentowały również węższy zakres wielkości niż sfery MS2 (ryc. 62 B). Ponadto, analiza sfer otrzymanych za pomocą desolwatacji acetonem przy użyciu metody śledzenia nanocząstek wykazała mniejszy rozmiar i węższą dystrybucję rozmiarów sfer MS1 oraz większy rozmiar i szerszą dystrybucję wielkości sfer MS2 (ryc. 62 C).



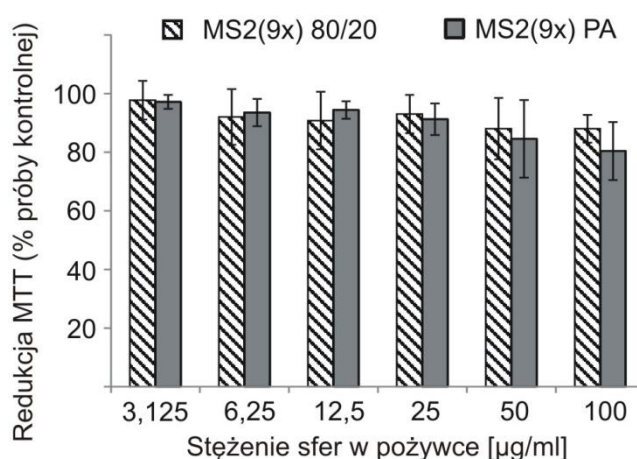
Rycina 62. Analiza wielkości sfer MS1 i MS2 wytwarzanych metodą desolwatacji acetonem. (A) Średnia wartość średnicy sfer MS1 i MS2. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe od średniej średnicy z trzech eksperymentów. (B) Zakres wielkości na podstawie pomiarów średnicy. Wąsy oznaczają wartości minimalne i maksymalne średnicy sfer. Górny bok pudełka oznacza pierwszy kwartył, dolny bok pudełka oznacza trzeci kwartył średnicy sfer. Pionową linią wewnątrz pudełka oznaczono medianę; (C) Dystrybucja rozmiarów sfer MS1 i MS2 analizowana przy użyciu metody śledzenia nanocząstek (*Nanoparticle Tracking*).

4.7 Biokompatybilność sfer

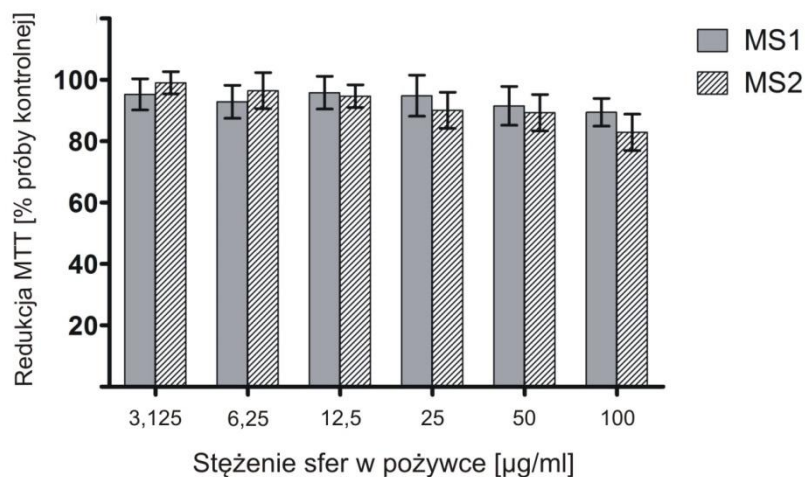
4.7.1 Cytotoksyczność sfer

Badano biokompatybilność wszystkich analizowanych wariantów sfer uformowanych z bioinżynierowanych jedwabii pajęczych. Przeprowadzono testy żywotności MTT komórek mysich fibroblastów 3T3 w hodowli *in vitro* po 48 godzinnej inkubacji z zawiesiną sfer.

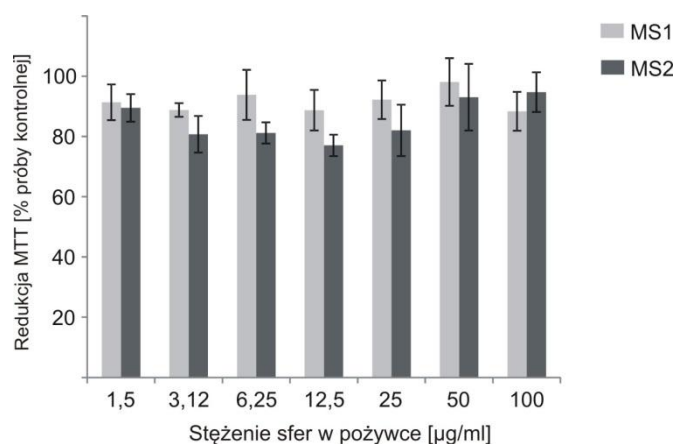
Żaden z analizowanych wariantów sfer nie wykazał statystycznie istotnej cytotoksyczności wobec fibroblastów NIH 3T3 po 48 godz. hodowli *in vitro*. Żywotność komórek nie ulegała zmianie pod wpływem sfer MS2(9x) 80/20 i PA (ryc. 63), sfer MS1 i MS2 wytwarzanych w procesie wysalania fosforanem potasu (ryc. 64) oraz sfer MS1 i MS2 uzyskanych w procesie koacerwacji acetonem (ryc. 65) w stężeniach od 3,125 do 100 µg sfer na 1 ml pożywki.



Rycina 63. Cytotoksyczność sfer MS2(9x) 80/20 i PA oceniana za pomocą testu MTT wobec mysich fibroblastów NIH 3T3 po 48 godzinach inkubacji. % redukcji MTT przedstawiono w odniesieniu do komórek kontrolnych nietraktowanych sferami. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe od średniej redukcji MTT z trzech niezależnych eksperymentów.



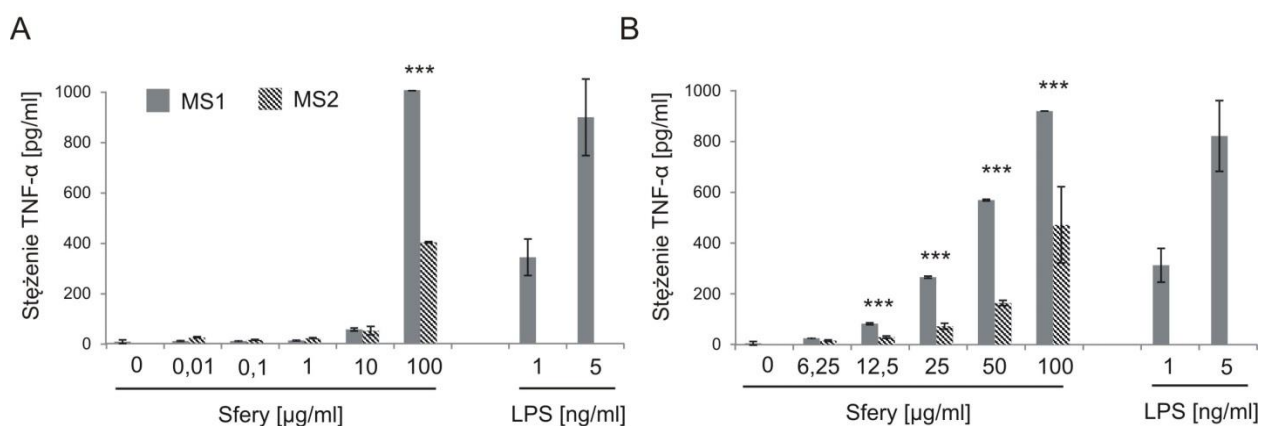
Rycina 64. Cytotoksyczność sfer MS1 i MS2 wytwarzanych w fosforanie potasu. Żywotność komórek badano za pomocą testu MTT stosując mysie fibroblasty NIH 3T3 inkubowane przez 48 godz. ze sferami. % redukcji MTT przedstawiono w odniesieniu do komórek kontrolnych nietraktowanych sferami. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe od średniej redukcji MTT z trzech niezależnych eksperymentów.



Rycina 65. Cytotoksyczność sfer MS1 i MS2 wytwarzanych w acetonie. Żywotność komórek badano za pomocą testu MTT stosując mysie fibroblasty NIH 3T3 inkubowane przez 48 godz. ze sferami. % redukcji MTT przedstawiono w odniesieniu do komórek kontrolnych nietraktowanych sferami. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe od średniej redukcji MTT.

4.7.2 Aktywacja makrofagów przez sfery MS1 i MS2

Immunogenność sfer MS1 i MS2 badano w teście aktywacji makrofagów, której wyznacznikiem jest sekrecja czynnika TNF- α . Badane sfery aktywowały makrofagi zależnie od stężenia. Istotnie wyższą sekrecję TNF- α indukowały sfery MS1, w porównaniu ze sferami MS2 w stężeniu powyżej 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Sfery MS1 i MS2 w najwyższym badanym stężeniu (100 $\mu\text{g/ml}$) aktywowały makrofagi w stopniu porównywalnym z, odpowiednio 5 i 1 ng/ml lipopolisacharydu (LPS). Zwiększone, w porównaniu z próbą nietraktowaną sferami, wydzielanie TNF- α obserwowano powyżej 1 $\mu\text{g/ml}$ sfer (ryc. 66).



Rycina 66. Wydzielanie TNF- α przez makrofagi J-774 traktowane sferami MS1 i MS2. A) Dziesiętne rozcieńczenia sfer w pożywce, B) Dwukrotne rozcieńczenia sfer w pożywce. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe ilości wydzielonego czynnika TNF- α z trzech eksperymentów. *** oznacza istotność statystyczną na poziomie $p < 0.001$.

5. Dyskusja

Skuteczny system dostarczania leku powinien opierać się na nośniku, który będzie łączył biokompatybilność, degradowalność, wytrzymałość mechaniczną, zdolność wydajnej inkorporacji leku oraz korzystny profil jego uwalniania (20). Nośnik taki ma docierać w miejsce przeznaczenia, uwalniać lek i być eliminowany nie pozostawiając toksycznych produktów degradacji (95). Zarówno materiał jak i proces wytwarzania nośnika mają kluczowe znaczenie dla jego właściwości, wiązania leku oraz biokompatybilności (21). Dobór odpowiedniego materiału, opracowanie optymalnych warunków wytwarzania nośników oraz dokładna charakterystyka ich właściwości fizycznych stanowią podstawę rozwoju systemu dostarczania leku.

Od dwóch dziesięcioleci na świecie prowadzone są intensywne badania nad konstrukcją i rozwojem nośników leków przeznaczonych do terapii ukierunkowanej, szczególnie w chorobach nowotworowych. Nadal nie ma „idealnego” nośnika, który spełniałby oczekiwania naukowców, klinicystów i chorych. Każde nowe rozwiązanie i strategia ma swoje ograniczenia.

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono konstrukcję i rozwój innowacyjnych nośników leków w formie sfer utworzonych z bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego. Zaprezentowano proces konstrukcji sztucznego genu kodującego bioinżynierowany jedwab pajęczy, jego ekspresję w bakteriach *E. coli*, oczyszczanie białka, optymalizację warunków wytwarzania sfer, charakterystykę właściwości fizycznych oraz potencjał przenoszenia leków przeciwnowotworowych. Cel główny przeprowadzonych badań został osiągnięty. Potwierdza on potencjał bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako idealnego materiału do wytwarzania nośników leków.

W niniejszej pracy wykazano, że: (i) bioinżynierowane białka pajęcze mogą być otrzymywane w wyniku ekspresji sztucznych genów zawierających powtórzenia sekwencji kodującej motyw konsensusowy naturalnych jedwabi pajęczych, (ii) proces oczyszczania bioinżynierowanych białek jedwabi pajęczych jest możliwy z wykorzystaniem ich naturalnych właściwości: stabilności termicznej oraz odporności na działanie kwasu organicznego, co eliminuje konieczność modyfikacji sekwencji białka domeną powinowactwa his-tag; (iii) bioinżynierowane białka jedwabi pajęczych tworzą sfery na drodze wysalania fosforanem potasu oraz koacerwacji rozpuszczalnikami organicznymi, (iv) zastosowana metoda oczyszczania białka ma wpływ na właściwości sfer oraz ich zdolność inkorporacji modelowych

leków, (v) sekwencja aminokwasowa bioinżynierowanego białka jedwabiu wpływa na proces wytwarzania sfer, właściwości fizyczne sfer oraz ich potencjał jako nośników chemioterapeutyków, (vi) wysokociśnieniowe pompy strzykawkowe mogą być wykorzystane do automatyzacji i standaryzacji procesu wytwarzania sfer, (vii) sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego nie wykazują cytotoksyczności i immunogenności, niezależnie od metody oczyszczania, rodzaju białka oraz metody wytwarzania sfer.

Ostatnio dokonano ogromnego postępu w dziedzinie wytwarzania nośników o opóźnionym bądź kontrolowanym profilu uwalniania leku (48). Obecne badania nad rozwojem takich cząstek skupiają się na poszukiwaniu nowych, a także udoskonalaniu stosowanych dotychczas materiałów do konstrukcji nośników oraz metod ich wytwarzania. Opracowano systemy dostarczania leku oparte na nośnikach nieorganicznych: nanocząstkach metali, nanocząstkach ceramicznych, nanorurkach oraz syntetycznych polimerach (4,6). Niewątpliwą zaletą tych nośników jest możliwość precyzyjnej kontroli ich właściwości poprzez manipulowanie składem chemicznym w procesie syntezy i koniugacji. Pomimo wysokiej efektywności dostarczania leku oraz niskiej toksyczności nośników *in vitro*, poważnym ich ograniczeniem pozostaje niedostateczna biokompatybilność (41). Nanocząstki metali nie są degradowane i eliminowane przez organizm, mogą się więc gromadzić w komórkach i tkankach (42). Produkty rozkładu biodegradowalnych polimerów syntetycznych takich jak PLA lub PLGA mogą powodować miejscowe zakwaszenie środowiska i wzrost ciśnienia osmotycznego (62). Ryzyko przewlekłej toksyczności spowodowanej nadmiarem trudno degradowalnych cząstek w obrębie tkanki jest głównym ograniczeniem tych systemów (256). Dodatkowo, metody wytwarzania nośników nieorganicznych oraz syntetycznych polimerów mogą ujemnie wpływać na ich biokompatybilność, a także powodować utratę właściwości biologicznych inkorporowanej substancji leczniczej (60,61).

Nośniki leków wytworzone z naturalnych materiałów takich jak wielocukry: chitosan, alginian i hialuronian, lub białka: żelatyna, albumina i jedwab pozwalają wyeliminować problemy toksyczności nośników.. Charakteryzują się one doskonałą biokompatybilnością oraz degradują do związków łatwo przyswajanych przez organizm (257). Jednakże, systemy te posiadają również swoje ograniczenia. Przykładowo, chitosan wykazuje silne właściwości higroskopijne, co skutkuje puchnięciem nośników w roztworach wodnych i szybkim uwalnianiem się załadowanego leku (35-37). Chemiczne sieciowanie tego biopolimeru rozwiązuje ten problem, może jednak stać się przyczyną toksyczności (102). Wśród

biopolimerów o pochodzeniu naturalnym, swoimi właściwościami wyróżnia się jedwab izolowany z kokonów jedwabnika *B. mori*. Posiada on dobrą wytrzymałość mechaniczną, charakteryzuje się doskonałą biokompatybilnością, a także może być przetworzony w rozmaite formy strukturalne (258).

Jedwab pajęczy posiada zalety jedwabiu jedwabników, przewyższa go jednak pod względem wytrzymałości mechanicznej. Jest on jednym z najbardziej obiecujących biomateriałów do wytwarzania nośników leku. Przeszkodą w wykorzystaniu tego biomateriału w produkcji nośników jest jednak limitowana dostępność. Wspólną wadą naturalnych biomateriałów jest ograniczona kontrola nad ich właściwościami, a także zależność parametrów biomateriału od źródła pochodzenia, co ogranicza możliwość standaryzacji nośnika (21).

Nośniki oparte na bioinżynierowanych białkach łączą zalety i eliminują wady zarówno syntetycznych polimerów jak i biomateriałów naturalnego pochodzenia. Biosynteza białek na matrycy sztucznych, inżynierowanych genów daje możliwość precyzyjnego kontrolowania właściwości biomateriału i dopasowania ich do danej aplikacji poprzez funkcjonalizację białka. Funkcjonalizacji dokonuje się na etapie konstrukcji sztucznego genu, poprzez dodanie fragmentu DNA kodującego domenę funkcyjną. W wyniku ekspresji takiego konstruktów powstaje białko posiadające domenę strukturalną oraz domenę nadającą białku nowe właściwości, przykładowo specyficzny profil biodegradacji, wrażliwość na zmiany pH, zdolność wiązania leku lub receptora komórkowego (125). Doniesienia dotyczące funkcjonalizowanych jedwabi pajęczych wskazują, że domeny funkcyjne zachowują swoją aktywność, a równocześnie nie wywierają negatywnego wpływu na właściwości białek jedwabiu (173,196). Bioinżynierowane jedwabie pajęcze były poddawane funkcjonalizacji domenami wiążącymi DNA, kierującymi nośnik do specyficznego miejsca w organizmie lub komórce (187,188,196).

Produkcja bioinżynierowanych białek odbywa się najczęściej w wyniku ekspresji sztucznego genu w heterologicznym gospodarzu w ściśle kontrolowanych i powtarzalnych warunkach, co znacząco ogranicza zmienność biomateriału. Białka jedwabi pajęczych posiadają prosty skład aminokwasowy oraz nie są poddawane modyfikacjom post-translacyjnym (202). Dzięki temu, do ich produkcji można wykorzystać najlepiej poznany, tani i wydajny system ekspresji w bakteriiach *E. coli* (259,260).

W ostatnich latach, systemy dostarczania leków oparte na białkach jedwabiu badano w postaci filmów (261), hydrożeli (262), kapsulek (180) oraz sfer (173,177). Cząstki te

wykazywały zdolność ładowania oraz uwalniania modelowych substancji aktywnych, niskocząsteczkowych leków, leków białkowych, a także kwasów nukleinowych (178,186,240). Podejmowane były próby kontrolowania kinetyki uwalniania leku poprzez zmianę właściwości białka jedwabiu (263). Doniesienia te wskazują na potencjał terapii z zastosowaniem nośników opartych na bioinżynierowanych jedwabiach pajęczych. Jednocześnie stwarzają one zapotrzebowanie na dalsze badania mające na celu wytwarzanie jedwabnych nośników o pożądanych cechach, a także na optymalizację i automatyzację procesu ich wytwarzania, mając na względzie ich przyszłe kliniczne zastosowania.

W pierwszej części niniejszej pracy otrzymano nowy, sztuczny gen jedwabiu pajęczego oraz wyprodukowano białko MS2(9x) będące 9-merem sekwencji konsensusowej spidroiny MaSp2 pająka *Nephila clavipes*. Badano wpływ metody oczyszczania na właściwości bioinżynierowanego białka jedwabiu pajęczego MS2(9x) oraz na właściwości otrzymywanych nośników. Zgodnie z aktualną wiedzą, białka jedwabiu wyprodukowane w heterologicznym systemie ekspresyjnym mogą być oczyszczane za pomocą chromatografii powinowactwa (21–24) denaturacji termicznej (202,207) lub ekstrakcji kwasem organicznym (203,207). Pierwsza metoda, wymaga dodatkowej modyfikacji sekwencji bioinżynierowanego białka i nie została zastosowana w niniejszej pracy. Metoda termiczna oraz metoda ekstrakcji kwasowej wykorzystują naturalną odporność białka jedwabiu na czynniki denaturujące: wysoką temperaturę oraz niskie pH (202,203,207). Ich ogromną zaletą jest brak domeny powinowactwa w sekwencji białka, wskutek czego otrzymuje się białka najbardziej zbliżone do naturalnych odpowiedników.

Przeprowadzone badania wykazały, iż zastosowanie denaturacji termicznej (80/20) oraz ekstrakcji kwasowej (PA) skutkowało otrzymaniem czystych i niezdegradowanych białek jedwabiu pajęczego, jednakże sfery otrzymane z tych białek różniły się pod względem morfologii, właściwości fizycznych oraz zdolności wiązania leku. Możliwa przyczyna leżąca u podstawy tych różnic wynikać może z różnego sfałdowania białek otrzymywanych w wyniku obu metod.

Bakterie wytwarzają białka opiekuńcze (chaperony) uczestniczące w procesie fałdowania białka (264). Chaperony wiążą się do niesfałdowanych ciągów aminokwasów hydrofobowych, zapobiegając ich kontaktom z wodnym środowiskiem cytoplazmy oraz niekontrolowanym oddziaływaniom międzycząsteczkowym, które skutkują agregacją i wytrącaniem się nowopowstałych białek (265). Ponieważ sekwencja MS2(9x) zawiera ciągi hydrofobowych

alanin, możliwe jest iż białka opiekuńcze gospodarza uczestniczą w fałdowaniu tego bioinżynierowanego białka, przez co mogą wpływać na jego strukturę drugorzędową. Zastosowane metody oczyszczania wykorzystują niezwykle stabilność białek jedwabiu w wysokiej temperaturze, oraz w środowisku kwaśnym. Białka bakteryjne wytrącane są z lizatu za pomocą wysokiej temperatury bądź kwasu organicznego, a następnie usuwane przez sedymentację, podczas gdy białko jedwabiu pozostaje w tych warunkach w roztworze. W metodzie termicznej białko jedwabiu jest wytrącane z roztworu za pomocą siarczanu amonu, a następnie ponownie rozpuszczane w 6M tiocyjanie guanidyny. Wysoka temperatura może doprowadzić do zerwania wiązań hydrofobowych w łańcuchu białka oraz osłabić oddziaływania hydrofobowe. Z kolei tiocyjanian guanidyny jest czynnikiem chaotropowym, który denaturuje białka i niszczy wiązania hydrofobowe (266). W wysokich stężeniach tiocyjanianu guanidyny białka tracą swoją strukturę drugorzędową (267). Oba te czynniki mogą przyczynić się do zniszczenia struktury drugo- i trzeciorzędowej białka MS2(9x). Powtórne fałdowanie tego białka prawdopodobnie odbywa się podczas dializy z roztworu tiocyjanianu guanidyny do 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Są to warunki odbiegające od tych panujących w cytoplazmie komórki bakteryjnej, brak jest też białek opiekuńczych, co prowadzi do utworzenia konformacji innej, niż w wyniku fałdowania przez bakterie. Protokół ekstrakcji kwasem propionowym nie obejmuje denaturacji i renaturacji oczyszczanych białek. Białko jedwabiu pozostaje w formie rozpuszczalnej. W procesie oczyszczania kwasem organicznym, niskie pH środowiska może spowodować zmianę stanu jonizacji łańcuchów bocznych aminokwasów. Zmienia to rozkład ładunków w obrębie łańcucha białkowego, co może doprowadzić do zaburzenia struktury białka spowodowanej elektrostatycznym odpychaniem się naładowanych grup bocznych. W związku z tym, że białko MS2(9x) nie zawiera aminokwasów obdarzonych ładunkiem, niskie pH może spowodować protonację jedynie końcowych grup karboksylowych. Ich udział w całkowitym ładunku cząsteczki białka jest jednak prawdopodobnie nieznaczący. Oznacza to, iż w procesie oczyszczania metodą PA, może zostać zaburzona struktura trzeciorzędowa białka, podczas gdy struktura drugorzędowa najprawdopodobniej pozostaje bez zmian.

Na różne sfałdowanie białek wskazują uzyskane wyniki spektrometrii FTIR i Ramana, Białko oczyszczane metodą PA posiada większą zawartość struktury β -kartki niż białko 80/20, które z kolei posiada więcej struktur nieuporządkowanych. Bioinżynierowany jedwab pajęczy eADF4(C16) oczyszczany metodą denaturacji termicznej również wykazywał wysoką zawartość struktur nieuporządkowanych (202,268). W niniejszej pracy nie udało się potwierdzić wyników spektroskopii FTIR i Ramana metodą dychroizmu kołowego. Dla obu wariantów białka

MS2(9x) w dychroizmie kołowym obserwowano zmiany struktury drugorzędowej zależne od stężenia białka. Metoda ta wykazała, iż wraz ze zmniejszaniem się stężenia maleje zawartość β -kartki w strukturze białka. Zjawisko to może być związane z właściwościami samoskładania białek jedwabiu, które w warunkach większego zagęszczenia cząstek białka i mniejszych odległości między nimi wytwarzają międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy grupami bocznymi alanin. Efekt ten może wzmacniać nieobecność w bioinżynierowanym jedwabiu niepowtarzających się domen końcowych, które w naturalnym jedwabiu pajęczym odpowiadają za utrzymanie tego białka w formie rozpuszczalnej (153,269). W naturze, białka jedwabi pajęczych MaSp1 i MaSp2 wydzielane są do światła gruczołu przedniego i magazynowane w stężeniu dochodzącym do 30-50%, przy czym nie następuje ich agregacja (270). *Badania NMR struktury białka znajdującego się w gruczole przednim wykazały, że rdzeń białek jedwabiu ma strukturę nieuporządkowaną lub znajduje się w konformacji helisy poliprolinowej typu II (ang. polyproline-type II helix) (150,270). Białka jedwabiu są więc zaliczane do białek natywnie nieuporządkowanych – IDP (z ang. intrinsically disordered proteins). Białka takie dostosowane są do szybkiej zmiany konformacji, wskutek czego wykazują właściwości samoorganizacji w formy strukturalne (271). Brak terminalnych domen kontrolujących konformację białka jedwabiu w bioinżynierowanych białkach jedwabiu, oraz udział bakteryjnych białek opiekuńczych w procesie ich fałdowania może spowodować przyjęcie konformacji różniącej się od tej naturalnie występującej w gruczole przednim. Oczyszczanie za pomocą denaturacji termicznej prawdopodobnie niszczy natywną konformację bioinżynierowanego białka i powoduje wzrost udziału regionów nieuporządkowanych w jego strukturze.*

Z obu wariantów bioinżynierowanego białka: MS2(9x) 80/20 i PA wytworzone zostały sferyczne cząstki o submikrometrowej średnicy. Sfery uzyskane z białek MS2(9x) 80/20 i PA prezentowały różną morfologię. Sfery MS2(9x) 80/20 miały gładką powierzchnię oraz zbitą strukturę wewnętrzną. Pod względem morfologii wykazywały one podobieństwo do sfer otrzymanych z białka eADF4(C16) przez Slotta i wsp. (228) oraz do sfer otrzymanych z jedwabiu naturalnego (250). Sfery PA posiadały natomiast porowatą strukturę na powierzchni oraz we wnętrzu. Według aktualnej wiedzy, nie obserwowano takiej morfologii w przypadku innych sfer wytwarzanych z jedwabi pajęczych lub jedwabiu *B. mori*. Bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego formowały sfery w procesie wysalania roztworem fosforanu potasu o stężeniu większym bądź równym 0,75 M. Prawdopodobnie mechanizm tworzenia się sfer zaproponowany wcześniej przez Slotta i wsp. ma zastosowanie również w przypadku badanych

białek. Dodanie fosforanu potasu inicjowało wewnątrz- i międzycząsteczkowe oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi ciągami alanin, co powodowało zmianę konformacji oraz agregację cząsteczek białka, co następnie skutkowało powstaniem sferycznych cząstek (228). Metoda ta była wcześniej stosowana do wytwarzania sfer z bioinżynierowanego jedwabiu eADF4(C16) oraz naturalnego jedwabiu *B. mori*. Sfery eADF4(C16) powstawały przy stężeniu fosforanu potasu minimum 0,4M, natomiast najniższe stężenie fosforanu zdolne zaindukować formowanie się sfer z jedwabiu naturalnego wynosiło 0,75M (228,250).

Rozmiar powstających sfer MS2(9x) oraz ich tendencja do agregacji zmniejszały się w skutek wysalania białek jedwabiu fosforanem potasu o większych stężeniach, co było prawdopodobnie spowodowane wolniejszym formowaniem sfer w niższych stężeniach fosforanu. Rozmiar sfer był precyzyjnie kontrolowany przez zastosowane stężenie białka jedwabiu. Najmniejszy średni rozmiar sfer - 370 nm otrzymano w warunkach 0,5mg/ml białka MS2(9x) oczyszczanego metoda 80/20. Zbliżoną wielkość sfer: 350 nm otrzymano w wyniku wysalania białka eADF4(C16), przy tym samym stężeniu białka i przy użyciu analogicznej metody mieszania (241). W przedstawionych badaniach, rozmiar sfer mierzony przy pomocy mikrofotografii elektronowej był średnio dwukrotnie mniejszy niż średnica hydrodynamiczna sfer wyznaczona w pomiarze dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Na różnicę tą mogło wpłynąć kurczenie się sfer na skutek dehydratacji poprzedzającej obserwację w mikroskopie elektronowym. Neubauer i wsp. wykazali, iż sfery eADF4(C16) w stanie uwodnionym mają o 27% większą średnicę niż po wysuszeniu, oraz że sfery te wracają do pierwotnego rozmiaru po wielokrotnych cyklach dehydratacji i rehydratacji (272). Kolejną przyczyną zaobserwowanych różnic, może być szeroki zakres wielkości badanych sfer. Ponieważ sfery o dużym rozmiarze rozpraszają światło silniej niż małe cząstki, mogły one zawyżyć otrzymany średni rozmiar sfer w próbie (273). W metodzie DLS szczególnie widoczna była różnica wielkości sfer MS2(9x) 80/20 i PA, co również mogło być spowodowane większym rozrzutem wielkości sfer MS2(9x) PA i występowaniem pojedynczych, dużych cząstek w próbie.

Analizy procentowego udziału struktur drugorzędowych nie wykazały różnic pomiędzy sferami MS2(9x) 80/20 i PA. Porównując zawartość struktur białka rozpuszczalnego oraz sfer wykazano, że podczas formowania sfer zawartość β -kardki wzrasta o ok. 15% i 8% odpowiednio w sferach MS2(9x) 80/20 i PA, głównie kosztem struktur nieuporządkowanych oraz częściowo helis. Większe zmiany w konformacji łańcucha białkowego zachodzą w trakcie formowania się sfer 80/20, co pozwala na ściślejsze upakowanie cząsteczek białka w strukturze sfery, co może również tłumaczyć mniejszy rozmiar i brak porowatości sfer MS2(9x) 80/20. W białku MS2(9x)

PA większa sztywność łańcucha białkowego, spowodowana większą zawartością struktury β -kardki, może być przyczyną ograniczonej możliwości przylegania do siebie łańcuchów białek, w konsekwencji prowadząc do powstania porowatych sfer o większym rozmiarze.

Różnice w samoskładaniu się białek MS2(9x) 80/20 i PA mogą być również przyczyną obserwowanych różnic w potencjale dzeta sfer. Sfery MS2(9x) PA wykazały niższy potencjał dzeta niż sfery MS2(9x) 80/20.. Różnica ta była odwrotna, niż w przypadku rozpuszczalnego białka – gdzie białko 80/20 posiadało niższy potencjał dzeta niż białko PA.. Helfricht i wsp. postulowali równomierny rozkład aminokwasów na powierzchni sfer eADF4(C16), wytworzonych z białka oczyszczonego metodą ekstrakcji termicznej (274). Możliwe jest zatem, iż sfery MS2(9x) 80/20 również charakteryzują się równomierną dystrybucją aminokwasów na swojej powierzchni. Sfery MS2(9x) PA, natomiast na skutek odmiennego układania się białek względem siebie, mogą eksponować na powierzchni więcej polarnych grup bocznych.

Bardziej ujemny ładunek sfer MS2(9x) PA oraz ich porowatość mogła być przyczyną większej wydajności ładowania dodatnio naładowanej doksorubicyny, w porównaniu do sfer MS2 (9x) 80/20. Dodatnio naładowana rodamina B wykazywała jednak podobną wydajność ładowania do obu typów sfer. Możliwe jest, że dzięki mniejszej masie cząsteczkowej rodamina mogła równomiernie wnikać do białkowego rdzenia obu rodzajów sfer. Większa lipofilowość rodaminy w porównaniu z doksorubicyną (logP odpowiednio 1,78 i 0,53) może wskazywać na większy udział wiązań hydrofobowych we wiązaniu rodaminy do białek jedwabiu.

Podsumowując, wariant białka MS2(9x) oczyszczany metodą termiczną wydaje się być bliższy białku naturalnemu. Co więcej, Dams-Kozłowska i wsp. wykazali, że białka oczyszczone poprzez ekstrakcję termiczną wykazują mniejszą immunogenność niż oczyszczone metodą PA (207). Metoda ta została więc wybrana do dalszych badań nad wpływem sekwencji bioinżynierowanego białka jedwabiu na właściwości sfer.

Stosując techniki inżynierii genetycznej, możliwa jest kontrola właściwości bioinżynierowanych białek jedwabiu poprzez modyfikację sekwencji białka. W niniejszej pracy doktorskiej porównano właściwości dwóch bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego: MS1 i MS2. Białka te były 15-merami sekwencji konsensusowych spidroin – odpowiednio MaSp1 i MaSp2 pająka *N. clavipes*.

Naturalne odpowiedniki analizowanych białek – spidroiny MaSp1 i MaSp2 charakteryzują się podobnym składem aminokwasowym. Ich sekwencja oparta jest głównie na alaninie

i glicynie, które skupiają się w obrębie dwóch naprzemiennie powtarzających się domen: polialaninowej i bogatej w glicynę (275,276). Białko MaSp2 posiada dodatkowo reszty prolinowe tworzące motywy GPGGX (277). Lewis i wsp. wykazali, że powtarzające się w bliskim sąsiedztwie motywy GPGGX tworzą β -zwroty układające się w struktury β -spirali, które nadają białku elastyczność (278). Obie spidroiny różnią się też stopniem hydropatyczności: białko MaSp1 posiada więcej hydrofobowych reszt aminokwasowych, natomiast białko MaSp2 jest bardziej hydrofilowe (161).

Bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego MS1 i MS2 formowały sfery w procesie wysalania fosforanem potasu. Białko MS1 tworzyło sfery dopiero w wysokim stężeniu fosforanu potasu (2M), podczas gdy sfery MS2 otrzymywano już przy stężeniu 1M. Sfery MS1 charakteryzowały się gładką powierzchnią, porami występującymi w ich wnętrzu oraz skłonnością do agregacji. Białko MS2 tworzyło kuliste sfery o gładkiej powierzchni, zbitym rdzeniu białkowym i dobrej dyspersji. Sfery MS2 były też średnio o 30% mniejsze niż sfery MS1 w tych samych warunkach wytwarzania.

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza zawartości struktur drugorzędowych wykazała większą zawartość β -karki w sferach MS2, co sugeruje ich większą stabilność i wytrzymałość mechaniczną (155,268). Porównanie struktury filmów utworzonych przez rozpuszczalne białka oraz sfer świadczy o tym, że w trakcie tworzenia się sfer MS1 i MS2 następował wzrost zawartości β -kartek i spadek procentowego udziału struktur nieuporządkowanych oraz helis. Zawartość struktur drugorzędowych w analizowanych sferach była zbieżna z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi różnych form morfologicznych wytworzonych z bioinżynierowanych białek jedwabiu opartych na sekwencji MaSp1 (175) oraz eADF4 (221).

Białko MaSp2, na którym bazowano wytwarzając sztuczny gen MS2 wykazuje strukturalną analogię do białka ADF4 pająka *A. diadematus*. Na podstawie tego drugiego, grupa prof. Scheibela skonstruowała bioinżynierowane białko eADF4(C16) (229,237,238,248,263). Sfery z białka eADF4(C16) miały podobną morfologię i właściwości fizyczne do sfer MS2: kulistą morfologię, dobrą dyspersję oraz ujemny potencjał dzeta (238). Rabotyagova i wsp. wykazali, że zwiększenie liczby i długości domen polialaninowych zwiększa zawartość struktur krystalicznych (β -kartek) w bioinżynierowanych jedwabiach pajęczych (175). Ponieważ oba analizowane białka zawierają tę samą liczbę bloków polialaninowych (po 15 w każdym białku), wyższa zawartość β -kartek w sferach MS2 może być spowodowana dłuższym ciągiem alanin:

8 reszt alanin w monomerze MS2 w porównaniu z monomerem MS1 - 5 reszt alanin. Większa zawartość struktur krystalicznych w strukturze sfer MS2 może być przyczyną ciaśniejszego upakowania cząsteczek białka w strukturze tych sfer (279). Dodatkowo, pory obecne we wnętrzu sfer MS1 oraz większy rozmiar tych cząstek w stosunku do sfer MS2 może sugerować luźniejszą strukturę sfer MS1. Nieobecność prolin w sekwencji białka MS1 ma najprawdopodobniej duże znaczenie dla różnic strukturalnych pomiędzy sferami MS1 i MS2 (280), gdyż reszty proliny powodują zakrzywienie struktury drugorzędowej białka (281).

Potencjał dzeta to ładunek występujący przy powierzchni cząstek w danym roztworze elektrolitu. Ładunek ten może wpływać na ładowanie i kinetykę uwalniania leku ze sfer, a także na interakcje sfer z docelowymi komórkami (263). Potencjał dzeta jest również istotny gdyż określa stabilność koloidalną zawiesiny cząstek. Za stabilne, czyli niemające tendencji do agregacji, uznaje się cząstki wykazujące potencjał dzeta powyżej 30 mV lub poniżej -30 mV. Im bliżej zerowego potencjału, tym cząstki są mniej stabilne w zawieszynie. Trend wartości potencjału dzeta sfer MS1 i MS2 był zgodny teoretycznym punktem izoelektrycznym budujących je białek. W fizjologicznym pH potencjał dzeta wynosił odpowiednio 10,83 i 5,27 dla sfer MS1 i MS2. Za dodatni ładunek sfer MS1 odpowiadać mogły dodatnio naładowane reszty arginin (pKa łańcucha bocznego - 12.48). Bliski zeru potencjał sfer MS1 świadczy o niestabilności i tendencji do agregacji, co jest zgodne ze wcześniejszymi obserwacjami.

W pracach prowadzonych przez inne grupy badające bioinżynierowany jedwab pajęczy wykazano, iż może on być nośnikiem niskocząsteczkowych leków oraz makromolekuł takich jak białka, wielocukry czy kwasy nukleinowe (177,178,186,263,282). Badania te obejmowały jednak najczęściej inkorporację i uwalnianie leków modelowych. Z uwagi na niski indeks terapeutyczny i działania niepożądane chemioterapeutyków, opracowanie nośników dla tych substancji jest wysoce pożądane. Leki cytostatyczne wywołują szereg działań niepożądanych będących efektem ich ogólnoustrojowej toksyczności. Pacjenci poddani chemioterapii cierpią z powodu anemii, neutropenii, wymiotów czy biegunek (283). Niektóre z chemioterapeutyków, w tym antracykliny, do których zalicza się dokсорubicynę i mitoksantron, prowadzić mogą do znacznie poważniejszych i nieodwracalnych działań niepożądanych takich jak kardiomiopatia czy trwałe uszkodzenie mięśnia sercowego (283,284). Poprawę indeksu terapeutycznego dokсорubicyny uzyskano stosując liposomalny system dostarczania tego leku zarejestrowany pod nazwą Doxil (285). Formulacja ta wykazywała zmniejszoną kardiotoxyczność dzięki zmianie dystrybucji dokсорubicyny. W porównaniu ze standardową metodą podania, większa ilość zamkniętej w liposomach dokсорubicyny dostawała się do środowiska guza, mniejsza zaś

akumulowała się w sercu i innych narządach (65,286). Sukces tego systemu potwierdza zasadność stosowania nośników leku do dostarczania cytostatyków. Wadą liposomalnych systemów dostarczania leku jest jednak ich niska stabilność fizykochemiczna (287), istnieje więc zapotrzebowanie na nowe skuteczne nośniki o lepszych właściwościach fizycznych.

W niniejszej pracy badano ładowanie do sfer MS1 i MS2 leków przeciwnowotworowych: jedno-dodatniej doksorubicyny, dwu-dodatniego mitoksantronu oraz neutralnego etopozydu. Leki te są stosowane w chemioterapii nowotworów piersi, raka jądra i mięsaka Kaposiego (288). Wszystkie badane cytostatyki należą do grupy inhibitorów topoizomerazy II. Interkalują one pomiędzy nici DNA zatrzymując działanie tego enzymu, w procesie transkrypcji (288). Leki te inkorporowano do sfer MS1 i MS2 za pomocą dwóch metod. Pierwsza strategia (PRE) polegała na dodaniu leku do roztworu białka jedwabiu, po czym roztwór ten mieszano z fosforanem potasu indukując powstanie sfer. Druga metoda (POST) polegała na inkubacji sfer w roztworze leku.

Wykazano, że stosowana metoda ma znaczący wpływ na wydajność ładowania leku. Duża różnica w wydajności ładowania pomiędzy doksorubicyną oraz mitoksantronem ładowanym metodami PRE mogła być skutkiem odmiennego zachowania molekuł leku w roztworze fosforanu potasu o wysokiej sile jonowej. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem wysokiej efektywności inkorporacji doksorubicyny w metodzie PRE jest przejście tego leku z formy rozpuszczalnej do nierozpuszczalnej i koprecypitacja z białkami jedwabiu (126). Xia i wsp. wykazali, że hydrofobowa forma doksorubicyny uczestniczy w tworzeniu nanocząstek z bioinżynierowanymi białkami SELP poprzez wiązanie z hydrofobowymi domenami tych białek (126). W przypadku badanych sfer, prawdopodobnie część wytrąconej z roztworu doksorubicyny związała się z hydrofobowymi regionami białek jedwabiu poprzez oddziaływanie pierścienia aromatycznego w cząsteczce leku z ciągami alanin. Przypuszczenie to może dodatkowo potwierdzać obserwacja, iż sfery ładowane tym lekiem w metodzie PRE mają znacznie mniejszy rozmiar niż sfery ładowane metodą POST. Hydrofobowe oddziaływania doksorubicyna-jedwab mogły przyspieszyć nukleację sfer i precypitację białka, co doprowadziło do powstawania mniejszych sfer. Obserwacja sfer ładowanych doksorubicyną w metodzie PRE pod mikroskopem konfokalnym wykazała, iż mimo jednakowej wydajności ładowania, sygnał fluorescencji doksorubicyny był obserwowany jedynie we wnętrzu sfer MS1. Sfery MS2 prezentowały natomiast sygnał jedynie na swojej powierzchni. Wytłumaczeniem tego zjawiska może być występowanie zawady przestrzennej spowodowanej oddziaływaniami hydrofobowymi pomiędzy pierścieniami antrachinonowymi

dokсорubicyna-dokсорubicyna lub/i dokсорubicyna-białko. Takie tłumienie fluorescencji obserwowane było wcześniej w przypadku liposomalnych formułacji dokсорubicyny (289). Można przypuszczać, iż zjawisko to dotyczy zarówno sfer MS2 jak i MS1. Obserwowany w sferach MS1 sygnał fluorescencji może natomiast wynikać z obecności niezwiązanej wiązaniem hydrofobowym dokсорubicyny wewnątrz porów występujących w białkowym rdzeniu tych sfer.

W przeciwieństwie do dokсорubicyny, która stosując metodę PRE, ładowała się z blisko 100% wydajnością, mitoksantron nie ładował się w tej metodzie do sfer MS1 i MS2. Lek ten ma tendencję do tworzenia dimerów, które ograniczają jego wiązanie do białek, a jednocześnie nie upośledzają rozpuszczalności (290). Prawdopodobnie lek ten utworzył dimery wskutek działania dużej siły jonowej fosforanu potasu o pH 8. Dimery te nie związały się z białkami i zostały wypłukane z zawiesiny sfer. Etopozyd – lek o neutralnym ładunku związał się w podobnym stopniu do obu typów sfer, prawdopodobnie dzięki oddziaływaniom hydrofobowym.

W drugiej metodzie ładowania (POST) leki wnikają do wnętrza jedwabnych sfer na zasadzie dyfuzji. W przypadku innych jedwabnych sfer wykazano iż działania elektrostatyczne odgrywają ważną rolę w ładowaniu leków do sfer (240,282,291). Zgodnie z tym założeniem, w przypadku sfer MS1 i MS2 dodatnio naładowane dokсорubicyna i mitoksantron powinny ładować się z większą wydajnością do ujemnie naładowanych sfer MS2. Uzyskane wyniki pokazują jednak odwrotną zależność, co świadczyć może o większym znaczeniu oddziaływań hydrofobowych w procesie ładowania leków do sfer MS1 i MS2. Wcześniejsze wyniki uzyskane w Zakładzie Immunologii Nowotworów (173) oraz wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wykazały, jednak że dokсорubicyna wydajnie ładuje się do pozytywnie naładowanych sfer MS1. Prawdopodobnie inkorporacja tego leku odbywa się na zasadzie oddziaływań hydrofobowych z cząsteczkami jedwabiu. Zgodnie z tymi obserwacjami Sieb i wsp., badający inkorporację leków do filmów z jedwabiu *B. mori* zaproponowali ostatnio mechanizm inkorporacji leku na skutek współdziałania oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych (291).

Dwa czynniki mogły przyczynić się do większej wydajności ładowania sfer MS1. Po pierwsze, zbity struktura sfer MS2 spowodowana wysoką zawartością β -katek może stanowić barierę dla dyfundujących cząstek leku, natomiast luźniejsze upakowanie cząsteczek białka MS1 oraz wewnętrzne pory prawdopodobnie ułatwiały dyfuzję leku do wnętrza sfer MS1. Hydrofobowość białek jedwabiu jest drugim czynnikiem mogącym wpływać na wydajność

ładowania leków. Z wartości współczynnika hydropatyczności GRAVY (z ang. *Grand Average of Hydrophobicity*) obu białek wynika, iż białko MS1 jest bardziej hydrofobowe niż białko MS2. (współczynniki GRAVY odpowiednio -0.145 i -0.535). Może to wskazywać na silniejsze oddziaływania cząsteczek leku z białkiem MS1. Współdziałanie oddziaływań elektrostatycznych w inkorporacji doksorubicyny może potwierdzać zmiana potencjału dzeta sfer MS2, z wartości ujemnych na dodatnie, sugerująca adsorpcję dodatnio naładowanego leku na powierzchni tych sfer.

Oprócz wysokiej wydajności ładowania leku, nośnik powinien być zdolny do jego uwalniania w sposób opóźniony lub kontrolowany, tak aby terapeutyk został uwolniony dopiero w miejscu przeznaczenia, a minimalne ilości „wyciekały” do krwiobiegu. Początkowe, gwałtowne uwolnienie się leku z nośnika (z ang. *burst release*) jest zjawiskiem negatywnym, gdyż duża jednorazowo uwolniona dawka leku może wywołać efekty toksyczności leku w zdrowych tkankach organizmu (292). Analizując uwalnianie inkorporowanych chemioterapeutyków w badanych systemach obserwowano uwolnienie się w pierwszej godzinie od 20 do 83% inkorporowanego leku, w zależności od leku, rodzaju sfer oraz metody ładowania. Zjawisko to może być związane z odpłukiwaniem się słabo zaadsorbowanego leku z powierzchni sfer lub spomiędzy agregatów sfer. Sugeruje to konieczność wstępnego płukania nośników przed ich aplikacją.

Uwalnianie doksorubicyny inkorporowanej przy użyciu metody PRE w obydwu typach sfer było stopniowe i mogło być związane z przechodzeniem hydrofobowej doksorubicyny w formę rozpuszczalną i jej stopniową dyfuzją na powierzchnię sfer, skąd uwalniała się do roztworu. Początkowe gwałtowne uwolnienie się leku z tych sfer mogło być związane z rozpuszczeniem się wytrąconej przez fosforan potasu doksorubicyny niezwiązanej ze sferami. Obserwowany szybki ubytek zawartości leku w sferach MS2 ładowanych doksorubicyną i mitoksantronem (metodą POST) był prawdopodobnie spowodowany wypłukiwaniem się leku zaadsorbowanego poprzez oddziaływania elektrostatyczne głównie na powierzchni tych sfer. Co ciekawe, w przypadku uwalniania leku o neutralnym ładunku – etopozydu mniej gwałtowne uwalnianie się leku obserwowano w obu typach sfer ładowanych metodą POST.

W dalszym postępowaniu doksorubicynę uwalniano przez 14 dni w buforach o pH 7,4, 6 i 4,5 ze sfer MS1 i MS2. Zastosowane wartości pH odpowiadają poszczególnym organelom komórkowym, do których może trafić cząstka absorbowana do komórki: odpowiednio: cytoplazmy, wczesne endosomy oraz lizosomy.

Wykazano, iż niezależnie od metody ładowania oraz rodzaju białka, niskie pH przyspieszało uwalnianie doksorubicyny. Profil uwalniania leku ładowanego metodą PRE był podobny w pH 6 oraz 4,5 i bardzo zbliżony w pH 7,4 w przypadku obu rodzajów sfer. Sfery MS2 ładowane metodą POST uwalniały lek znacznie szybciej niż sfery MS1, a ponadto wykazywały duży początkowy wyrzut leku. Szybsze uwalnianie doksorubicyny ze sfer MS2 ładowanych metodą POST, w porównaniu do sfer MS1 może wiązać się z mniejszą początkową ilością ładowanego leku oraz wiązaniem głównie na powierzchni sfer MS2. Zależność kinetyki uwalniania doksorubicyny jest zbieżna z wynikami uzyskanymi przez inne grupy badawcze, które analizowały zależne od pH uwalnianie doksorubicyny ze sfer uzyskanych z jedwabiu *B. mori* (41,54). Obserwacje te są korzystne dla tych formułacji leku, ponieważ sugerują one, że wzmożone uwalnianie leku następować będzie dopiero po wnikięciu nośnika do lizosomów komórki. Alternatywnie, w przypadku biernego dostarczania cząstek do środowiska guza i ich akumulacji związanej z efektem EPR, niższe pH, które występuje w obrębie nowotworu może również przyspieszać uwalnianie się terapeutycznego do mikrośrodowiska guza (294).

Kinetyka uwalniania zależy od ładowania leku (metody), rozmiaru cząstki, rozmiaru cząsteczki leku oraz siły oddziaływań biomateriał – lek. Uwalnianie leku z biodegradowalnego polimerowego nośnika *in vivo* jest skomplikowanym procesem, na który składają się: dyfuzja cząstek leku przez pory w matrycy polimeru, degradacja biopolimeru oraz jego puchnięcie (4). Według mechanizmu zaproponowanego przez Lammela i wsp. uwalnianie leku z jedwabnych nośników odbywa się na zasadzie powolnej dyfuzji cząsteczek leku z wnętrza sfery na jej powierzchnie, skąd zostaje odpłukany (250). Blüm i Scheibel wykazali, iż kinetykę uwalniania leku ze sfer eADF4(C16) można dodatkowo modyfikować poprzez zastosowanie czynników sieciujących (282). Istnieje jednak obawa, że działanie to może być przyczyną toksyczności nośnika.

Podsumowując wyniki badań nad inkorporacją chemioterapeutyków, w niniejszej pracy doktorskiej wykazano, iż bioinżynierowany jedwab pajęczy jest potencjalnym nośnikiem leku. Wydajność inkorporacji leku zależy od zastosowanej metody ładowania oraz właściwości białka takich jak hydrofobowość, ilość struktur krystalicznych oraz ładunek. Możliwe jest dalsze doskonalenie nośników leku w celu zwiększenia wydajności ładowania oraz kontrolowanej kinetyki uwalniania poprzez modyfikację sekwencji bioinżynierowanego jedwabiu. Doblhofer i Scheibel wykazali, że zmiana pojedynczego aminokwasu w sekwencji bioinżynierowanego jedwabiu umożliwiła ładowanie oranżu akrydynowego oraz cząstek DNA, które wcześniej nie wykazywały powinowactwa do białka eADF4(C16) (263). Idąc o krok dalej, możliwa jest

funkcjonalizacja bioinżynierowanego białka jedwabiu domeną mającą powinowactwo do substancji terapeutycznej (117). Przykładowo, Numata i wsp. uzyskali kompleksy oraz sfery z bioinżynierowanego jedwabiu posiadającego polilizynową domenę wiążącą plazmidowe DNA (186,295), a Jansson i wsp. zaprezentowali bioinżynierowany jedwab połączony z IgG (196).

Sfery MS1 wykazały większe powinowactwo do badanych chemioterapeutyków, a jednocześnie wykazywały tendencję do agregacji i charakteryzowały się mniejszą stabilnością koloidalną. Sfery MS2, natomiast charakteryzowały się lepszą dyspersją i mniejszym rozmiarem, wykazywały jednak mniejszą wydajność ładowania leków i szybsze uwalnianie.

Optymalne właściwości nośnika leku mogą być zatem uzyskane poprzez kontrolowane mieszanie tych dwóch białek. Florczak A. (rozprawa doktorska) wykazała, że mieszanie funkcjonalizowanych wariantów białek MS1 i MS2 w stosunku wagowym 80: 20 poprawia morfologię sfer i zmniejsza ich skłonność do agregacji nie wpływając ujemnie na ich właściwości takie jak zdolność do wiązania komórek przeciwnowotworowych i inkorporacji doksorubicyny. Co ciekawe, stosunek ten odpowiada stosunkowi zawartości białek MaSp1 i MaSp2 (naturalnych odpowiedników białek MS1 i MS2) we włóknie jedwabiu wiodącego *N. clavipes* (143).

W celu dalszego doskonalenia systemu dostarczania leków opartego na bioinżynierowanych jedwabiach pajęczych istnieje zapotrzebowanie na metodę wytwarzania nośników, która pozwoli uzyskać sfery o określonym rozmiarze. Jest to ważne ze względu na ograniczenia stawiane nośnikom przez ludzki organizm. Cząstki o średnicy powyżej 300 nm łatwiej ulegają wychwytywaniu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy oraz makrofagi (296). Ponadto, cząstki te łatwiej ulegają opsonizacji i aktywują układ dopełniacza, na skutek czego są eliminowane z krwiobiegu (10). Pomimo, iż efekt EPR pozwala przedostać się do środowiska guza cząstkom o średnicy do 600 nm, dalsza droga do wnętrza komórek jest znacznie ograniczona dla cząstek powyżej 150 nm (297). Konieczne jest zatem opracowanie metody pozwalającej uzyskiwać sfery o możliwie jak najmniejszych rozmiarach, nieprzekraczających 300 nm, oraz jednorodnych pod względem rozmiaru. Ponadto, z perspektywy zastosowań klinicznych istnieje potrzeba standaryzacji nośników. Proces ich wytwarzania musi więc być powtarzalny, ściśle kontrolowany oraz wydajny.

W niniejszej pracy, w celu minimalizacji rozmiaru sfer oraz automatyzacji procesu ich wytwarzania zastosowano system mikromieszania złożony z wysokociśnieniowych pomp strzykawkowych. W systemie tym pompy połączono z wężykami wyprowadzającymi

o wewnętrznej średnicy 250 i 500 μm połączonymi za pomocą trójnika o średnicy strefy mieszania odpowiadającej średnicy wężyków. Pompy sterowano za pomocą cyfrowego kontrolera. Pilotowe eksperymenty przeprowadzano przy użyciu białka MS2. W niniejszej pracy, uzyskano redukcję wielkości sfer w stosunku do mieszania pipetą oraz zmniejszono rozrzut wielkości otrzymywanych cząstek. Otrzymano sfery MS2 o średnicy odpowiednio 360 nm i 250 nm. Zmniejszanie stężenia białka okazało się nieefektywne z powodu niewielkiej redukcji rozmiaru przy znacznym zmniejszeniu wydajności. Dalszą poprawę jednorodności sfer uzyskano poprzez zmniejszenie średnicy strefy mieszania i wężyków do 250 μm oraz zwiększenie szybkości przepływu roztworów.

Lammel i wsp. przy użyciu analogicznego systemu również wykazali, że rozmiar sfer eADF4(C16) może być kontrolowany szybkością przepływu roztworów i ich mieszania w trójniku łączącym oba strumienie płynów, o średnicy 500 μm (229). Przy prędkości mieszania 2 i 50 ml/min otrzymano sfery o średniej wielkości odpowiednio 290 i 250 nm. Wynik ten w porównaniu do sfer otrzymanych dzięki mieszaniu za pomocą pipety (350 nm średnicy) pozwolił na znaczną redukcję sfer otrzymywanych z tego samego stężenia jedwabiu. Dalsze zmniejszanie rozmiaru otrzymywanych sfer w metodzie wysalania jedwabiu fosforanem potasu może zostać osiągnięte przez podniesienie temperatury roztworów. Rozmiary sfer otrzymane przez Lucke i wsp. z białka eADF4(c16) w temperaturze 60°C były mniejsze niż sfery otrzymywane w temperaturze pokojowej przy analogicznych parametrach mieszania (241,248). Poza wymienionymi zaletami, zastosowany w tej pracy system mikromieszania w znaczny sposób ułatwił i przyspieszył produkcję nośników. Co więcej może on być również przystosowany do większej skali wytwarzania sfer. Dodatkowo, sprzężenie tej metody z szybkim i efektywnym sposobem oczyszczania sfer z roztworu fosforanu potasu opartym na kasetach ultrafiltracyjnych pozwala na uzyskanie znaczącej ilości nośnika w krótkim czasie.

W niniejszej pracy podjęto również próby wytwarzania sfer przy użyciu alternatywnej metody tj. desolwatacji w rozpuszczalnikach organicznych. W pilotowym eksperymencie przedstawionym w niniejszej pracy wykazano, iż sfery MS1 oraz MS2 o średnicach odpowiednio 204 nm i 302 nm mogą być wytworzone za pomocą mieszania z acetonem. Ta strategia wytwarzania nośników wydaje się być obiecującą alternatywą dla wysalania białka fosforanem potasu, która pozwala na osiągnięcie nanometrycznych nośników leku. Metoda ta pozwoliła zredukować średni rozmiar sfer MS1 o 460 nm, oraz sfer MS2 o 140 nm w stosunku do wysalania fosforanem potasu. Właściwości tak powstałych sfer, ich zdolność ładowania leku oraz właściwości ich funkcjonalizowanych wariantów muszą być poddane dalszym badaniom.

Szczególną uwagę zwrócić należy na biokompatybilność tak otrzymanych nośników, gdyż pozostałości rozpuszczalników organicznych mogą być źródłem cytotoksyczności. Metoda desolwatacji acetonem była wcześniej stosowana przez Seiba i wsp., Kundu i wsp oraz Zhang i wsp. do wytwarzania sfer o średniej wielkości odpowiednio 98 nm, 150-170 nm oraz 35-125 nm z jedwabiu *B. mori* (293,298,299).

Jak wcześniej zaznaczono, biokompatybilność jest jednym z podstawowych warunków jakie musi spełnić nośnik leku. Najlepsze właściwości w tym zakresie posiadają nośniki biopolimerowe, w tym te zbudowane z bioinżynierowanych białek. Istotne jest również zastosowanie biokompatybilnego systemu wytwarzania nośników z uwagi na toksyczne odczynniki, które mogą pozostawać w strukturze nośnika i następnie indukować cytotoksyczność oraz wywierać negatywny wpływ na aktywność biologiczną leku. W niniejszej pracy wytwarzano jedwabne sfery w procesie inspirowanym tworzeniem się włókien jedwabiu w naturze – wysalaniem białka fosforanem potasu. Przedstawiono również alternatywną metodę koacerwacji przy użyciu acetonu. Biokompatybilność otrzymanych sfer oceniano *in vitro*. Wykazano, że żaden z wariantów sfer nie indukował efektu cytotoksyczności. Warto podkreślić, iż pomimo że we wcześniejszych badaniach nad cytotoksycznością białek MS1 oczyszczanych metodami 80/20 i PA białko oczyszczane metodą PA wykazywało większą cytotoksyczność w najwyższych badanych stężeniach (100 i 1000 µg/ml) (207), w przypadku sfer nie obserwowano podobnego efektu. Przyczyną tego mogło być usunięcie roztworu, w którym znajdowało się oczyszczone białko podczas dializy następującej po wytworzeniu sfer. Przyczyna obserwowanej wcześniej immunogenności mogła zatem znajdować się w roztworze uzyskiwanym w procesie oczyszczania, nie zaś w samym białku jedwabiu.

Za użytecznością bioinżynierowanych jedwabnych nośników jako system dostarczania leków przemawiają również niedawne doniesienia Lucke i wsp. Grupa ta wykazała, że sfery z białka jedwabiu eADF4(C16) były stabilne – nie ulegały degradacji i nie zmieniały morfologii w procesie sterylizacji w 121 oraz 134°C (248). Oznacza to, iż nośniki te mogą być przygotowywane w niesterylnych warunkach i poddawane sterylizacji przed ładowaniem lekiem i podaniem, co znacząco ułatwia proces produkcji nośników do zastosowań klinicznych (248).

Stosowanie białkowych sfer do dostarczania leku może wzbudzać obawy o immunogenność takich nośników. Jedwab, zarówno naturalny jak i pajęczycy jest uważany za nisko immunogenne białko m. in. z uwagi a swój skład aminokwasowy (258). Jedwabne biomateriały budujące rusztowania do wzrostu komórek, są dobrze tolerowane i nie indukują

reakcji zapalnej *in vivo*, a jedwabne siatki chirurgiczne, używane m.in. do wzmocnienia powłok brzusznych po operacjach przepuklin, uzyskały akceptację FDA (291,300). W niniejszej pracy badano odpowiedź *in vitro* makrofagów na sfery z jedwabiu MS1 i MS2. Wykazano, że sfery aktywowały makrofagi w sposób zależny od stężenia, przy czym produkcja TNF α w odpowiedzi na traktowanie sferami MS1 była silniejsza niż wobec sfer MS2. Przyczyną tego może być tendencja do tworzenia agregatów przez sfery MS1 oraz większa hydrofobowość białka MS1 (wg. współczynnika GRAVY). Można również przypuszczać, że dodatnio naładowane sfery MS1 są chętniej fagocytowane przez makrofagi niż sfery MS2 o ujemnym ładunku. Wzmoczoną aktywację makrofagów i produkcję TNF α obserwowali Panilatis i wsp. oraz Cui i wsp. badając odpowiedź makrofagów na mikrometryczne cząstki fibroiny *B. mori* (301,302). Nie obserwowano natomiast aktywacji makrofagów przez jedwabne włókna oraz filmy (300,302).

Podsumowując, sfery z bioinżynierowanych białek pajęczych to nośniki o dużym potencjale do zastosowań w chemioterapii. Bioinżynierowany jedwab łączy w sobie cechy materiałów syntetycznych: precyzyjną kontrolę i powtarzalność produkcji oraz możliwość funkcjonalizacji z biokompatybilnością i biodegradowalnością naturalnych biomateriałów. Niniejsza praca wskazuje na zależności pomiędzy właściwościami nośników leku a sekwencją białka, technikami jego oczyszczania a także warunkami wytwarzania nośnika. Przedstawia również modyfikacje procesu wytwarzania w celu otrzymania najbardziej optymalnych cech nośnika leku. Wykazano, iż zdolność inkorporacji i kinetyka uwalniania leku zależy zarówno od właściwości nośnika, ale także od sposobu inkorporacji leku. Zaprezentowano również strategie mające na celu osiągnięcie pożądanego, nanometrycznego rozmiaru nośników oraz automatyzację procesu ich produkcji, co jest konieczne do klinicznych zastosowań opracowywanego systemu. Warto podkreślić uniwersalność nośników przedstawionych w niniejszej pracy. W oparciu o nośniki z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego można rozwijać inne systemy dostarczania leku dobierając odpowiednią parę lek-domena funkcyjna. Ponadto, badane jedwabne sfery mogą również znaleźć zastosowanie poza medycyną jako nośnik kosmetyków, substancji zapachowych, lub substancji odżywczych.

6. Wnioski

- (i) Bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego można otrzymać z dużą wydajnością w bakteryjnym systemie ekspresji. Oczyszczanie bioinżynierowanych białek pajęczych jest możliwe dzięki wykorzystaniu naturalnych właściwości jedwabiu: stabilności termicznej i odporności na działanie kwasu organicznego.
- (ii) Właściwości bioinżynierowanych białek oraz otrzymywanych z nich sfer zależą od zastosowanej metody oczyszczania białka.
- (iii) Sekwencja aminokwasowa bioinżynierowanego białka jedwabiu determinuje jego zdolność formowania sfer, właściwości sfer oraz ich potencjał jako nośniki leku.
- (iv) Chemioterapeutyki mogą być ładowane do jedwabnych sfer i uwalniane w sposób zależny od pH. Wydajność ładowania zależy od sekwencji aminokwasowej białka oraz zastosowanej metody inkorporacji poszczególnych leków.
- (v) Wysokociśnieniowe pompy strzykawkowe mogą być użyte jako automatyczny system wytwarzania sfer. Użycie pomp powoduje zmniejszenie średnicy i rozrzutu wielkości otrzymywanych sfer
- (vi) Sfery z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych można otrzymać w procesie desolwatacji acetonem.
- (vii) Sfery z białek bioinżynierowanych jedwabi pajęczych są biokompatybilne. Nie wykazują cytotoksyczności, niezależnie od metody oczyszczania białka, sekwencji aminokwasowej białka oraz metody wytwarzania sfer.

7. Streszczenie

Nośniki leków mogą przyczyniać się do poprawy skuteczności terapii poprzez akumulację substancji leczniczej, przedłużenie jej działania, wydłużenie okresu półtrwania substancji terapeutycznych, poprawę ich biodostępności oraz zmniejszenie toksyczności. Nośnik leku powinien charakteryzować się nanometrycznym rozmiarem, zdolnością wiązania i uwalniania leku, być bezpieczny dla organizmu oraz ulegać degradacji i eliminacji po spełnieniu swojej funkcji. Dodatkowo, materiał stosowany do wytwarzania nośników leku powinien być wystarczająco wytrzymały i stabilny, aby nie ulec degradacji w drodze do miejsca przeznaczenia. Wytwarzanie nośników leku z materiałów nieorganicznych oraz syntetycznych polimerów stwarza ryzyko toksyczności nośnika wobec tkanek organizmu, natomiast zastosowanie naturalnych biopolimerów może wiązać się ze zmiennymi właściwościami nośników. Jedwab pajęczycy to biomateriał o dobrych właściwości mechanicznych, takich jak wiążkość, elastyczność i wytrzymałość mechaniczna. Jako białkowy biopolimer jest on biokompatybilny i biodegradowalny. Pomimo, iż trudno jest pozyskać naturalny jedwab pajęczycy w czystej postaci i w wystarczających ilościach, rozwój technik produkcji bioinżynierowanego jedwabiu pajęczycy i metod jego oczyszczania skutecznie rozwiązał problem jego dostępności i uutorował drogę do dalszych badań nad wykorzystaniem tego białka do wytwarzania nośników leku.

Białka jedwabiu pajęczycy mają zdolność do samoorganizacji w sferyczne cząstki, które mogą być stosowane jako nośniki do dostarczania leków. Metody inżynierii genetycznej zapewniają precyzyjną kontrolę nad sekwencją aminokwasową tych białek, przez co, na poziomie molekularnym, zapewniają wpływ na właściwości biomateriału takie jak ładunek, hydrofobowość oraz struktura drugorzędowa. Co więcej, właściwości jedwabnych nośników leku mogą być kontrolowane także na etapie oczyszczania białek, tworzenia sfer i ładowania leków.

Celem niniejszej pracy było opracowanie innowacyjnych nośników opartych na bioinżynierowanych białkach jedwabiu pajęczycy. Badano właściwości nośników (sfer) w zależności od zastosowanego protokołu oczyszczania białka, sekwencji białka, warunków wytwarzania sfer i sposobu ładowania leku. Badania obejmowały także optymalizację warunków wytwarzania nośnika, automatyzację procesu produkcji sfer oraz analizę biokompatybilności i immunogenności nośników z bioinżynierowanych jedwabi pajęczycy.

W pierwszym etapie realizacji projektu doktorskiego sklonowano sztuczny gen dla nowego bioinżynierowanego białka pajęczego – MS2(9x). Białko to wyprodukowano w systemie ekspresyjnym *E. coli* i oczyszczono za pomocą dwóch metod: denaturacji termicznej i ekstrakcji kwasowej. Metody te bazowały na naturalnych właściwościach jedwabiu: stabilności termicznej oraz odporności na działanie kwasu propionowego. Za pomocą obu metod uzyskano podobną wydajność oraz jakość oczyszczanego bioinżynierowanego białka jedwabiu pajęczego. Obserwowano różnice w strukturze drugorzędowej oraz potencjale dzeta białek rozpuszczalnych. Z białka MS2(9x) oczyszczanego obiema metodami wytworzono sfery poprzez wysalanie fosforanem potasu. Sfery otrzymane z białka oczyszczanego metodą denaturacji termicznej oraz ekstrakcji kwasowej posiadały różne właściwości takie jak: wielkość, morfologia, potencjał elektrokinetyczny i zdolność wiązania leku. Przyczyną zaobserwowanych różnic mogła być odmienna konformacja przestrzenna białek oczyszczanych za pomocą obu metod oraz jej wpływ na proces samoskładania białek jedwabiu. Dlatego też, dobór właściwej metody oczyszczania białka ma znaczenie w rozwoju systemu dostarczania leków bazującego na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym.

W kolejnym etapie badano wpływ sekwencji białka na właściwości nośnika leku. Analizowano dwa bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego: MS1 i MS2, których sekwencje oparto na sekwencjach białek pająka *N. clavipes*: odpowiednio MaSp1 i MaSp2. Białka te wyprodukowano w systemie ekspresyjnym *E. coli* i oczyszczono metodą ekstrakcji termicznej. Z obu białek wytworzono sfery poprzez wysalanie fosforanem potasu. Białka MS1 i MS2, różniące się sekwencją aminokwasową, tworzyły sfery o innej morfologii i wielkości. Wykazywały także różne właściwości fizyczne: potencjał dzeta i zawartość struktur drugorzędowych. Wielkość sfer formowanych z białek MS1 i MS2 mogła być kontrolowana za pomocą stężenia białek jedwabiu. Stężenie fosforanu potasu wpływało na proces tworzenia się sfer. Białko MS2 formowało sfery przy niższym stężeniu fosforanu potasu niż białko MS1. Sfery MS1 wykazały większą, niż sfery MS2, wydajność inkorporacji leków przeciwnowotworowych oraz wolniejsze tempo ich uwalniania. Wykazano, iż zdolność inkorporacji i kinetyka uwalniania leku zależy także od sposobu inkorporacji leku. Sfery z bioinżynierowanych jedwabiu pajęczych ładowane doksorubicyną za pomocą dyfuzji oraz koprecypitacji powoli uwalniały lek przez 14 dni w sposób powolny zależny od pH. Oba typy nośników utrzymywały swoją sferyczną morfologię po 14 dniach uwalniania leku, *in vitro*. Sfery MS1 wykazały większe powinowactwo do leków przeciwnowotworowych, miały jednakże skłonność do agregacji i były większe niż cząstki MS2, które z kolei charakteryzowały się lepszą morfologią ale szybciej uwalniały badane

chemioterapeutyki. Aby połączyć korzystne cechy obu białek, w dalszych badaniach można zastosować sfery wykonane z mieszanki białek MS1 i MS2.

W kolejnym etapie badań opracowano automatyczną metodę wytwarzania sfer przy użyciu wysokociśnieniowych pomp strzykawkowych. Zastosowanie metody mikromieszania za pomocą pomp przyczyniło się do uzyskania znacznych ilości sfer z bioinżynierowanego jedwabiu w powtarzalnych warunkach wytwarzania. Produkcja sfer za pomocą mikromieszania powodowała zmniejszenie się wielkości oraz zakresu wielkości otrzymanych sfer, w porównaniu do mieszania za pomocą pipety. Optymalizacja procesu poprzez zastosowanie mniejszej średnicy trójnika oraz wężyków systemu pomp, a także zwiększenie szybkości przepływu powodowało dalsze zmniejszenie rozmiaru sfer i uzyskanie węższego rozrzutu ich wielkości. Wytwarzanie sfer przy użyciu pomp strzykawkowych skutkowało otrzymaniem dużych objętości zawiesiny sfer w fosforanie potasu. Badane techniki ultrafiltracji pozwoliły na szybkie i skuteczne odzyskiwanie sfer z roztworu fosforanu potasu. System mikromieszania oraz ultrafiltracji umożliwił otrzymywanie dużych ilości jedwabnych sfer w powtarzalnych i kontrolowanych warunkach. Ponadto przeprowadzono testy alternatywnej metody wytwarzania sfer – desolwatacji za pomocą acetonu, która skutkowała formowaniem się małych i jednorodnych sfer o średniej wielkości 200 i 300 nm odpowiednio dla białek MS1 i MS2.

Niezależnie od metody oczyszczania, sekwencji białka jedwabiu oraz metody wytwarzania sfer, żaden z wariantów sfer z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych nie wykazywał właściwości cytotoksycznych. Badania immunogenności wykazały większą immunogenność sfer MS, w porównaniu do MS2 w stężeniu powyżej 12,5 µg/ml. Badania te potwierdziły, iż sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego mogą być z powodzeniem stosowane do zastosowań biomedycznych.

Podsumowując, bioinżynierowany jedwab łączy w sobie cechy materiałów syntetycznych: precyzyjną kontrolę i powtarzalność produkcji oraz możliwość funkcjonalizacji z biokompatybilnością i biodegradowalnością naturalnych biomateriałów. Z białka tego uzyskać można nośniki leków, których właściwości mogą podlegać precyzyjnej kontroli, na wielu etapach procesu wytwarzania. Istnieje również możliwość automatyzacji i zwiększenia skali produkcji jedwabnych nośników. Cechy te, w połączeniu z powinowactwem do leków przeciwnowotworowych wskazują na duży potencjał sfer z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako nośnika leków, w tym chemioterapeutyków.

8. Abstract

Drug carriers can improve the effectiveness of therapy by causing an accumulation of the drug, prolonging the half-life of the therapeutic agents, improving their bioavailability and reducing their toxicity. A drug carrier should fulfill requirements of biocompatibility, biodegradability, nanoscale size as well as ability to bind and release the bioactive compound. The biomaterial used to form a drug delivery vehicle should also be durable enough to transport the active compounds within an organism. Spider silk is in the focus of research due to superior mechanical properties such as high toughness, elasticity and mechanical strength. The use of drug carriers made of inorganic materials, synthetic polymers, involve a risk of toxicity to the tissues of the body carrier, whereas and the use of natural biopolymers may be associated with variable carrier properties. As a protein-based material, silk is biocompatible and biodegradable. Although native spider silk is difficult to obtain in a pure form and in sufficient quantities, the development of recombinant spider silk production techniques and purification methods successfully solved the accessibility problem and paved the way for further research. Spider silk proteins have an ability to self-assemble into spherical particles that can be utilized for drug delivery. Bioengineering of the silk sequence provides an unique possibility to control the drug carrier properties such as charge, hydrophobicity and secondary structure on the molecular level. Moreover, the carrier properties can be controlled at further processing steps such as protein purification, sphere formation process and drug loading.

The objective of the study was to generate the bioengineered spider silk biomaterial for an innovative drug carrier. The properties of the material were investigated with respect to the impact of the applied protein purification protocol, protein sequence, sphere formation conditions and drug loading method on the properties of the drug carrier. The studies involved optimization of sphere processing conditions, scaling-up and atomization of the sphere production process and analyses of the biocompatibility of bioengineered spider silk spheres.

In the first part of the study, the new bioengineered protein MS2(9x) was purified using two methods: thermal and acidic extraction. Both methods are based on innate silk properties: thermal stability and resistance to acid. They produced silk proteins of similar quantity and purity; however, silk spheres made of these purified variants differed in critical features as particle size, morphology, surface charge and drug binding potential. The applied purification method probably resulted in differences in the secondary structure of the soluble silk, which further affected the silk assembly process and, therefore, the biomaterial's properties. The close

analysis of applied purification protocol and protein secondary structure indicated a difference in the processes which could affect the final silk folding or protein chemistry. Therefore, the applied protein purification method affects the carrier properties and needs to be taken under consideration in the drug delivery system development.

In the next step, the influence of the protein sequence on the drug carrier properties was studied. The two bioengineered spider silks: MS1 and MS2 were analyzed. These proteins were derived from the *N. clavipes* spidroins: MaSp1 and MaSp2, respectively. Recombinant proteins were produced in *E. coli* expression host and purified by thermal extraction. The bioengineered spider silk proteins formed stable spherical particles in the salting-out method, with potassium phosphate. The MS1 and MS2 proteins had different amino acid sequence and they formed spheres of different morphology and size. The size of the particles was controlled by the concentration of the silk protein mixed with phosphate, while the phosphate concentration influenced the process of particle formation. MS2 protein spheres were formed at a lower concentration than potassium phosphate protein MS1.

Spheres made of the MS1 and MS2 protein showed different properties and different affinity to anti-cancer drugs. MS1 particles showed stronger affinity and slower pace of release of the anti-cancer drugs than MS2 spheres. These results indicated the impact of a hydrophobic interaction drug-silk protein on the process of loading and release. It has been also shown that the ability of incorporation and release kinetics of the drug depend also on the method of drug incorporation. The silk spheres loaded with doxorubicin by means of diffusion and co-precipitation slowly released the drug for 14 days in a slow, pH-dependent manner. Both types of drug carriers maintained their spherical structure after 14 days of drug release at physiological conditions *in vitro*. The MS1 spheres showed higher affinity to anticancer drugs but had a tendency to aggregate and were bigger than the MS2 particles, which, in turn showed higher burst release of analyzed chemotherapeutics. To combine the positive features of both proteins, the spheres can be made of a blend of MS1 and MS2 protein, at specific ratio.

In the next stage of the study an automated method for producing spheres using a high pressure syringe pumps was developed. Application of the micromixing system enabled obtaining substantial amounts of the bioengineered spider silk spheres under the repetitive production conditions. Sphere formation by micromixing resulted in smaller size and narrower size distribution of obtained spheres, comparing to mixing with pipette. Application of smaller diameter of the mixing T- element and tubes as well as acceleration of the flow rate caused further decrease in the sphere size and size distribution. Sphere production using the

micromixing system resulted in large volumes of sphere suspension in potassium phosphate. Micromixing system and ultrafiltration enabled scaling up of the sphere production process under controllable and repeatable conditions.

Ultrafiltration techniques enabled fast and efficient recovery of the spheres from the phosphate buffer and their concentration in the water suspension. The alternative method of the sphere formation: desolvation with acetone produced small and homogenous MS1 and MS2 spheres with sizes of 200 and 300 nm, respectively and a narrow size distribution.

Independent of the purification method, protein sequence or sphere formation method, none of the bioengineered silk sphere variants was cytotoxic, which confirmed that they can be used successfully for drug carriers and other biomedical applications. The MS1 spheres showed higher immunogenicity than the sphere of MS2 in a concentration above 12.5 µg/ml.

In summary, the bioengineered spider silk combines the features of synthetic materials: precise control and repeatability of the production process, the possibility of functionalization with biocompatibility and biodegradability of natural biomaterials. Silk proteins can form drug carriers and their properties can be precisely controlled at controlled at multiple stages. Moreover, it is possible to automate and scale-up the process of silk carrier production. The results indicate a high potential of silk spheres for use as a drug carrier in medicine, in particular oncology. These features, combined with the affinity to anti-cancer drugs will determine the potential of bioengineered spider silk spheres as the drug carriers including carriers for cancer therapy.

9. Literatura

1. Nelson E. Kinetics of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion. *J Pharm Sci.* 1961 Mar 1;50(3):181–92.
2. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Controlled Release.* 2014 Sep;190:485–99.
3. Bernkop-Schnürch A. Nanocarrier systems for oral drug delivery: do we really need them? *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2013 May 13;49(2):272–7.
4. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2010 Jun 15;1(1):149–73.
5. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev.* 2012 Mar 12;41(7):2971–3010.
6. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2740.
7. Mout R, Moyano DF, Rana S, Rotello VM. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2539.
8. Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2545.
9. Kommareddy S, Amiji M. Poly(ethylene glycol)-modified thiolated gelatin nanoparticles for glutathione-responsive intracellular DNA delivery. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2007 Mar;3(1):32–42.
10. Garnett MC, Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med.* 2006;56(5):307–11.
11. Stolnik S, Illum L, Davis SS. Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995 Sep;16(2–3):195–214.
12. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995 Sep 1;55(17):3752–6.
13. Maeda H, Matsumura Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1989;6(3):193–210.
14. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;624:25–37.
15. Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(197):55–86.
16. Curnis F, Sacchi A, Corti A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J Clin Invest.* 2002 Aug 15;110(4):475–82.
17. Dyzmann-Sroka A, Malicki J. Cancer incidence and mortality in the Greater Poland Region-Analysis of the year 2010 and future trends. *Rep Pract Oncol Radiother J Gt Cancer Cent Pozn Pol Soc Radiat Oncol.* 2014 Sep;19(5):296–300.
18. Zhang J, Lan CQ, Post M, Simard B, Deslandes Y, Hsieh TH. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Cancer Genomics-Proteomics.* 2006;3(3-4):147–57.
19. Lohcharoenkal W, Wang L, Chen YC, Rojanasakul Y. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1–12.
20. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Aug;9(8):615–27.
21. Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2011 Mar 10;150(2):128–41.
22. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2012 Feb;8(2):147–66.

23. Feng S-S. Nanoparticles of biodegradable polymers for cancer treatment. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(30):4146–7.
24. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv*. 2015 Jan;6(1):41–58.
25. Van Dongen MA, Dougherty CA, Banaszak Holl MM. Multivalent polymers for drug delivery and imaging: the challenges of conjugation. *Biomacromolecules*. 2014 Sep 8;15(9):3215–34.
26. Majdalawieh A, Kanan MC, El-Kadri O, Kanan SM. Recent advances in gold and silver nanoparticles: synthesis and applications. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014 Jul;14(7):4757–80.
27. Wang K, Yao H, Meng Y, Wang Y, Yan X, Huang R. Specific aptamer-conjugated mesoporous silica-carbon nanoparticles for HER2-targeted chemo-photothermal combined therapy. *Acta Biomater*. 2015 Jan 14;
28. Lee H-J, Sanetuntikul J, Choi E-S, Lee BR, Kim J-H, Kim E, et al. Photothermal cancer therapy using graphitic carbon-coated magnetic particles prepared by one-pot synthesis. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:271–82.
29. Khandare J, Calderón M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2824.
30. Wang J, Gong C, Wang Y, Wu G. Magnetic nanoparticles with a pH-sheddable layer for antitumor drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Jun 1;118:218–25.
31. Castillo PM, de la Mata M, Casula MF, Sánchez-Alcázar JA, Zaderenko AP. PEGylated versus non-PEGylated magnetic nanoparticles as camptothecin delivery system. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:1312–9.
32. Chertok B, David AE, Yang VC. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials*. 2010 Aug;31(24):6317–24.
33. Jain TK, Roy I, De TK, Maitra A. Nanometer Silica Particles Encapsulating Active Compounds: A Novel Ceramic Drug Carrier. *J Am Chem Soc*. 1998;120(43):11092–5.
34. Chen Y, Chen H, Shi J. Inorganic nanoparticle-based drug codelivery nanosystems to overcome the multidrug resistance of cancer cells. *Mol Pharm*. 2014 Aug 4;11(8):2495–510.
35. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*. 1994 Mar 18;263(5153):1600–3.
36. Chen Y, Chen H, Shi J. In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 2013 Jun 18;25(23):3144–76.
37. Mundra RV, Wu X, Sauer J, Dordick JS, Kane RS. Nanotubes in biological applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2014 Aug;28:25–32.
38. Rastogi V, Yadav P, Bhattacharya SS, Mishra AK, Verma N, Verma A, et al. Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells. *J Drug Deliv*. 2014;2014:1–23.
39. Wang JT-W, Fabbro C, Venturelli E, Ménard-Moyon C, Chaloin O, Da Ros T, et al. The relationship between the diameter of chemically-functionalized multi-walled carbon nanotubes and their organ biodistribution profiles in vivo. *Biomaterials*. 2014 Nov;35(35):9517–28.
40. Wu P, Li S, Zhang H. Design real-time reversal of tumor multidrug resistance cleverly with shortened carbon nanotubes. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:2431–8.
41. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133–49.
42. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(18):3995–4021.

43. Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol*. 2005 Nov;146(6):882–93.
44. Lin W, Huang Y-W, Zhou X-D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Dec 15;217(3):252–9.
45. Chang J-S, Chang KLB, Hwang D-F, Kong Z-L. In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ Sci Technol*. 2007 Mar 15;41(6):2064–8.
46. Panyam J, Zhou W-Z, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Aug;16(10):1217–26.
47. Song XR, Cai Z, Zheng Y, He G, Cui FY, Gong DQ, et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2009 Jun 28;37(3-4):300–5.
48. Anselmo AC, Mitragotri S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *J Controlled Release*. 2014 Sep;190:15–28.
49. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Controlled Release*. 2014 Sep;190:465–76.
50. Wang T, Petrenko VA, Torchilin VP. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. *Mol Pharm*. 2010 Aug 2;7(4):1007–14.
51. Zhang Y, Huang Y, Li S. Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2014 Aug;15(4):862–71.
52. Li J, He Z, Yu S, Li S, Ma Q, Yu Y, et al. Micelles based on methoxy poly(ethylene glycol)-cholesterol conjugate for controlled and targeted drug delivery of a poorly water soluble drug. *J Biomed Nanotechnol*. 2012 Oct;8(5):809–17.
53. Hami Z, Amini M, Ghazi-Khansari M, Rezayat SM, Gilani K. Doxorubicin-conjugated PLA-PEG-Folate based polymeric micelle for tumor-targeted delivery: synthesis and in vitro evaluation. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci*. 2014;22:30.
54. Batrakova EV, Dorodnych TY, Klinskii EY, Kliushnenkova EN, Shemchukova OB, Goncharova ON, et al. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *Br J Cancer*. 1996 Nov;74(10):1545–52.
55. Bala V, Rao S, Boyd BJ, Prestidge CA. Prodrug and nanomedicine approaches for the delivery of the camptothecin analogue SN38. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2013 Nov 28;172(1):48–61.
56. Matsumura Y, Yokoyama M, Kataoka K, Okano T, Sakurai Y, Kawaguchi T, et al. Reduction of the side effects of an antitumor agent, KRN5500, by incorporation of the drug into polymeric micelles. *Jpn J Cancer Res Gann*. 1999 Jan;90(1):122–8.
57. Malik N, Evagorou EG, Duncan R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs*. 1999 Sep;10(8):767–76.
58. Khatri S, Das NG, Das SK. Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of MES-SA uterine cancer cells. *J Pharm Bioallied Sci*. 2014 Oct;6(4):297–302.
59. Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2009 Mar;71(3):445–62.
60. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2003 Jul 31;90(3):261–80.
61. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Feb 24;55(3):329–47.
62. Brunner A, Mäder K, Göpferich A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion. *Pharm Res*. 1999 Jun;16(6):847–53.

63. Chaudhury A, Das S. Folate Receptor Targeted Liposomes Encapsulating Anti-Cancer Drugs. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015 Jan 18;
64. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2014 Dec 26;200C:138–57.
65. Gabizon AA, Barenholz Y, Bialer M. Prolongation of the Circulation Time of Doxorubicin Encapsulated in Liposomes Containing a Polyethylene Glycol-Derivatized Phospholipid: Pharmacokinetic Studies in Rodents and Dogs. *Pharm Res*. 1993 May 1;10(5):703–8.
66. Lehr C-M, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm*. 1992 Jan 1;78(1–3):43–8.
67. Yang M-H, Chung T-W, Lu Y-S, Chen Y-L, Tsai W-C, Jong S-B, et al. Activation of the ubiquitin proteasome pathway by silk fibroin modified chitosan nanoparticles in hepatic cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):1657–76.
68. Piras AM, Sandreschi S, Maisetta G, Esin S, Batoni G, Chiellini F. Chitosan Nanoparticles for the Linear Release of Model Cationic Peptide. *Pharm Res*. 2015 Jan 6;
69. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Controlled Release*. 2004 Nov;100(1):5–28.
70. Miyazaki S, Yamaguchi H, Yokouchi C, Takada M, Hou WM. Sustained-release and intragastric-floating granules of indomethacin using chitosan in rabbits. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1988 Oct;36(10):4033–8.
71. Shiraishi S, Imai T, Otagiri M. Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. *J Controlled Release*. 1993 Jun;25(3):217–25.
72. Ghaz-Jahanian MA, Abbaspour-Aghdam F, Anarjan N, Berenjian A, Jafarizadeh-Malmiri H. Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery. *Mol Biotechnol*. 2014 Nov 11;
73. Jain A, Thakur K, Kush P, Jain UK. Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: formulation, characterization and cytotoxicity studies. *Int J Biol Macromol*. 2014 Aug;69:546–53.
74. Da Silva SB, Amorim M, Fonte P, Madureira R, Ferreira D, Pintado M, et al. Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery. *Pharm Biol*. 2014 Dec 9;1–11.
75. Lee SJ, Min HS, Ku SH, Son S, Kwon IC, Kim SH, et al. Tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles as a platform delivery carrier in cancer diagnosis and therapy. *Nanomed*. 2014 Aug;9(11):1697–713.
76. Chen Z, Zhang L, Song Y, He J, Wu L, Zhao C, et al. Hierarchical targeted hepatocyte mitochondrial multifunctional chitosan nanoparticles for anticancer drug delivery. *Biomaterials*. 2015 Jun;52:240–50.
77. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28(6):621–30.
78. Ciofani G, Raffa V, Menciassi A, Micera S, Dario P. A drug delivery system based on alginate microspheres: Mass-transport test and in vitro validation. *Biomed Microdevices*. 2007 Jun 1;9(3):395–403.
79. Li P, Dai Y-N, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q. Chitosan-Alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *Int J Biomed Sci IJBS*. 2008;4(3):221.
80. Ahmad Z, Khuller GK. Alginate-based sustained release drug delivery systems for tuberculosis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Dec;5(12):1323–34.
81. Ahn D-G, Lee J, Park S-Y, Kwark Y-J, Lee KY. Doxorubicin-loaded alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) micelles for cancer imaging and therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Dec 24;6(24):22069–77.

82. Chen B, Miller RJ, Dhal PK. Hyaluronic acid-based drug conjugates: state-of-the-art and perspectives. *J Biomed Nanotechnol.* 2014 Jan;10(1):4–16.
83. Liao Y-H, Jones SA, Forbes B, Martin GP, Brown MB. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Deliv.* 2005 Jan 1;12(6):327–42.
84. Brown M, Jones S. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005 May;19(3):308–18.
85. Han HS, Choi KY, Ko H, Jeon J, Saravanakumar G, Suh YD, et al. Bioreducible core-crosslinked hyaluronic acid micelle for targeted cancer therapy. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2014 Dec 27;200C:158–66.
86. Han HS, Thambi T, Choi KY, Son S, Ko H, Lee MC, et al. Bioreducible Shell-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules.* 2015 Jan 7;
87. Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P. Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv.* 1978;53(1):17–23.
88. Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm.* 2000;194(1):91–102.
89. Wang G, Uludag H. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based nanoparticles. 2008 [cited 2015 Jan 2]; Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425247.5.5.499>
90. Peters T. Serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1985;37:161–245.
91. Kratz F, Roth T, Fichiner I, Schumacher P, Fiebig HH, Unger C. In vitro and in vivo efficacy of acid-sensitive transferrin and albumin doxorubicin conjugates in a human xenograft panel and in the MDA-MB-435 mamma carcinoma model. *J Drug Target.* 2000;8(5):305–18.
92. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2008 Dec 18;132(3):171–83.
93. Takakura Y, Fujita T, Hashida M, Sezaki H. Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice. *Pharm Res.* 1990 Apr;7(4):339–46.
94. Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006 Feb 15;12(4):1317–24.
95. Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 May 22;60(8):876–85.
96. Nyman DW, Campbell KJ, Hersh E, Long K, Richardson K, Trieu V, et al. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Nov 1;23(31):7785–93.
97. Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother.* 2006 Jun;7(8):1041–53.
98. Jahanshahi M, Sanati MH, Babaei Z. Optimization of parameters for the fabrication of gelatin nanoparticles by the Taguchi robust design method. *J Appl Stat.* 2008 Dec 1;35(12):1345–53.
99. Babaei Z, Jahanshahi M, Sanati MH. Fabrication and evaluation of gelatin nanoparticles for delivering of anti - cancer drug. *Int J Nanosci Nanotechnol.* 2008 Dec 30;4(1):23–30.
100. Coester C, Nayyar P, Samuel J. In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2006 Apr;62(3):306–14.
101. Schwick HG, Heide K. Immunochemistry and immunology of collagen and gelatin. *Bibl Haematol.* 1969;33:111–25.
102. Jameela SR, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone

- and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*. 1995 Jul;16(10):769–75.
103. Lee GY, Park K, Nam JH, Kim SY, Byun Y. Anti-tumor and anti-metastatic effects of gelatin-doxorubicin and PEGylated gelatin-doxorubicin nanoparticles in SCC7 bearing mice. *J Drug Target*. 2006 Dec;14(10):707–16.
 104. Duclairoir C, Orecchioni A-M, Depraetere P, Osterstock F, Nakache E. Evaluation of gliadins nanoparticles as drug delivery systems: a study of three different drugs. *Int J Pharm*. 2003 Mar 6;253(1-2):133–44.
 105. Gulfam M, Kim J, Lee JM, Ku B, Chung BH, Chung BG. Anticancer drug-loaded gliadin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2012 May 29;28(21):8216–23.
 106. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc*. 2011 Sep 22;6(10):1612–31.
 107. Zhao Z, Chen A, Li Y, Hu J, Liu X, Li J, et al. Fabrication of silk fibroin nanoparticles for controlled drug delivery. *J Nanoparticle Res*
 108. Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *J Controlled Release* [Internet]. 2014 Jun
 109. Mathur AB, Gupta V. Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications. *Nanomed*. 2010 Jul;5(5):807–20.
 110. Seib FP, Kaplan DL. Doxorubicin-loaded silk films: Drug-silk interactions and in vivo performance in human orthotopic breast cancer. *Biomaterials*. 2012 Nov;33(33):8442–50.
 111. Seib FP, Pritchard EM, Kaplan DL. Self-Assembling Doxorubicin Silk Hydrogels for the Focal Treatment of Primary Breast Cancer. *Adv Funct Mater*. 2013 Jan 7;23(1):58–65.
 112. Cheema SK, Gobin AS, Rhea R, Lopez-Berestein G, Newman RA, Mathur AB. Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *Int J Pharm*. 2007 Aug;341(1-2):221–9.
 113. Seib FP, Jones GT, Rnjak-Kovacina J, Lin Y, Kaplan DL. pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Adv Healthc Mater*. 2013 Dec;2(12):1606–11.
 114. Wu P, Liu Q, Li R, Wang J, Zhen X, Yue G, et al. Facile Preparation of Paclitaxel Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Enhanced Antitumor Efficacy by Locoregional Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Dec 11;5(23):12638–45.
 115. Subia B, Kundu SC. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers. *Nanotechnology*. 2013 Jan 25;24(3):035103.
 116. Gupta V, Aseh A, Ríos CN, Aggarwal BB, Mathur AB. Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:115.
 117. Jastrzebska K, Kucharczyk K, Florczak A, Dondajewska E, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. *Rep Pract Oncol Radiother* [Internet]. 2014 Dec [cited 2015 Jan 24];
 118. Chen M, Shao Z, Chen X. Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Jan;100A(1):203–10.
 119. Gobin AS, Rhea R, Newman RA, Mathur AB. Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(1):81.
 120. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2012 Jul 20;161(2):496–504.
 121. Urry DW. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. *J Phys Chem B*. 1997;101(51):11007–28.
 122. Megeed Z, Haider M, Li D, O'Malley BW, Cappello J, Ghandehari H. In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. *J Controlled Release*. 2004;94(2):433–45.
 123. Valluzzi R, Winkler S, Wilson D, Kaplan DL. Silk: molecular organization and control of assembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002 Feb 28;357(1418):165–7.

124. Janib SM, Pastuszka M, Aluri S, Folchman-Wagner Z, Hsueh P-Y, Shi P, et al. A quantitative recipe for engineering protein polymer nanoparticles. *Polym Chem.* 2014 Jan;5(5):1614–25.
125. MacKay JA, Shi P, Gustafson J. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. *Int J Nanomedicine.* 2014 Mar;1617.
126. Xia X-X, 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 Mar 10;15(3):908–14.
127. Römer L, Scheibel T. The elaborate structure of spider silk: Structure and function of a natural high performance fiber. *Prion.* 2008;2(4):154.
128. David Kaplan, W. Wade Adams, Barry Farmer, Christopher Viney. *Silk: Biology, Structure, Properties, and Genetics. Silk Polymers* [Internet]. American Chemical Society; 1993 [cited 2015 Jan 23]. p. 2–16.
129. Lewis R. Unraveling the Weave of Spider Silk. *Bioscience.* 1996;46(9).
130. Ko FK, Jovicic J. Modeling of mechanical properties and structural design of spider web. *Biomacromolecules.* 2004 Jun;5(3):780–5.
131. Omenetto FG, Kaplan DL. New opportunities for an ancient material. *Science.* 2010 Jul 30;329(5991):528–31.
132. Gatesy J, Hayashi C, Motriuk D, Woods J, Lewis R. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science.* 2001 Mar 30;291(5513):2603–5.
133. Allmeling C, Jokuszies A, Reimers K, Kall S, Choi CY, Brandes G, et al. Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration. *Cell Prolif.* 2008 Jun;41(3):408–20.
134. Heim M, Keerl D, Scheibel T. Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber. *Angew Chem Int Ed.* 2009 May 4;48(20):3584–96.
135. Florczak A, Piekos K, Kazmierska K, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. [Engineered spider silk: the intelligent biomaterial of the future. Part I]. *Postępy Hig Med Dośw Online.* 2011;65:377–88.
136. Hu X, Vasanthavada K, Kohler K, McNary S, Moore AMF, Vierra CA. Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Jul 4;63(17):1986–99.
137. Winkler S, Kaplan DL. Molecular biology of spider silk. *J Biotechnol.* 2000 Aug;74(2):85–93.
138. Rising A, Nimmervoll H, Grip S, Fernandez-Arias A, Storckenfeldt E, Knight DP, et al. Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence. *Zoolog Sci.* 2005 Mar;22(3):273–81.
139. Rising A, Hjäl m G, Engström W, Johansson J. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules.* 2006 Nov;7(11):3120–4.
140. 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(6):e514.
141. Xu M, Lewis RV. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(18):7120–4.
142. Lewis RV. Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. *Chem Rev.* 2006 Sep;106(9):3762–74.
143. Spö nner A, Schlott B, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weisshart K. Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry (Mosc).* 2005 Mar 29;44(12):4727–36.
144. Humenik M, Smith AM, Scheibel T. Recombinant Spider Silks—Biopolymers with Potential for Future Applications. *Polymers.* 2011 Mar 17;3(1):640–61.
145. Van Beek JD, Hess S, Vollrath F, Meier BH. The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10266–71.

146. Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, Savage KN. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol.* 1999 Dec;202(Pt 23):3295–303.
147. Papadopoulos P, Sölter J, Kremer F. Hierarchies in the structural organization of spider silk—a quantitative model. *Colloid Polym Sci.* 2008 Dec 3;287(2):231–6.
148. Problem Solving in Nature and TRIZ [Internet]. *The Triz Journal.* [cited 2015 Jan 25]. Available from: <http://www.triz-journal.com/comparing-problem-solving-in-nature-and-triz/>
149. Lefèvre T, Paquet-Mercier F, Rioux-Dubé JF, Pézolet M. Structure of silk by Raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers.* 2011;
150. Lefèvre T, Leclerc J, Rioux-Dubé J-F, Buffeteau T, Paquin M-C, Rousseau M-E, et al. Conformation of Spider Silk Proteins In Situ in the Intact Major Ampullate Gland and in Solution. *Biomacromolecules.* 2007 Aug;8(8):2342–4.
151. Knight DP, Knight MM, Vollrath F. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int J Biol Macromol.* 2000 Jun 13;27(3):205–10.
152. 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 May 13;465(7295):236–8.
153. 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 May 13;465(7295):239–42.
154. Scheibel T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Factories.* 2004;3(1):14.
155. Chen X, Knight DP, Shao Z, Vollrath F. Conformation Transition in Silk Protein Films Monitored by Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Effect of Potassium Ions on *Nephila* Spidroin Films †. *Biochemistry (Mosc).* 2002 Dec;41(50):14944–50.
156. Dicko C, Kenney JM, Knight D, Vollrath F. Transition to a β -Sheet-Rich Structure in Spidroin in Vitro: The Effects of pH and Cations †. *Biochemistry (Mosc).* 2004 Nov;43(44):14080–7.
157. Dicko C, Knight D, Kenney JM, Vollrath F. Secondary Structures and Conformational Changes in Flagelliform, Cylindrical, Major, and Minor Ampullate Silk Proteins. Temperature and Concentration Effects. *Biomacromolecules.* 2004 Nov;5(6):2105–15.
158. Teulé 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.* 2011;
159. Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998 Jan;49(1):31–8.
160. Fahnestock SR, Bedzyk LA. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997 Jan;47(1):33–9.
161. Huemmerich D, Scheibel T, Vollrath F, Cohen S, Gat U, Ittah S. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol.* 2004;14(22):2070–4.
162. Lazaris A. Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. *Science.* 2002 Jan 18;295(5554):472–6.
163. Scheller J, Gührs KH, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol.* 2001 Jun;19(6):573–7.
164. Williams D. Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. *Med Device Technol.* 2003 Jun;14(5):9–11.
165. 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 Biotechnol J.* 2004 Sep;2(5):431–8.

166. Kluge JA, Rabotyagova O, Leisk GG, Kaplan DL. Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol.* 2008;26(5):244–51.
167. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Self-Assembly of Genetically Engineered Spider Silk Block Copolymers. *Biomacromolecules.* 2009 Feb 9;10(2):229–36.
168. Xia X-X, Qian Z-G, 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. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(32):14059–63.
169. 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 (Mosc).* 2004 Oct;43(42):13604–12.
170. Eisoldt L, Hardy JG, Heim M, Scheibel TR. The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol.* 2010;170(2):413–9.
171. Numata K, Mieszawska-Czajkowska AJ, Kvenvold LA, Kaplan DL. Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromol Biosci.* 2012 Jan;12(1):75–82.
172. Numata K, Reagan MR, Goldstein RH, Rosenblatt M, Kaplan DL. Spider Silk-Based Gene Carriers for Tumor Cell-Specific Delivery. *Bioconjug Chem.* 2011;
173. Florczak A, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Functionalized Spider Silk Spheres As Drug Carriers for Targeted Cancer Therapy. *Biomacromolecules.* 2014 Jul 7;140707071957009.
174. Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomaszewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Feb;101A(2):456–64.
175. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Role of Polyalanine Domains in β^2 -Sheet Formation in Spider Silk Block Copolymers. *Macromol Biosci.* 2010 Jan 11;10(1):49–59.
176. Rammensee S, Slotta U, Scheibel T, Bausch AR. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(18):6590.
177. Lammel A, Schwab M, Hofer M, Winter G, Scheibel T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials.* 2011;32(8):2233–40.
178. Hofer M, Winter G, Myschik J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials.* 2011;
179. Blüm C, Scheibel T. Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles. *BioNanoScience.* 2012 Jun;2(2):67–74.
180. Blüm C, Nichtl A, Scheibel T. Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Adv Funct Mater.* 2014 Feb;24(6):763–8.
181. Heim M, Ackerschott CB, Scheibel T. Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. *J Struct Biol.* 2010 May;170(2):420–5.
182. Jansson R, Thatikonda N, Lindberg D, Rising A, Johansson J, Nygren P-Å, et al. Recombinant Spider Silk Genetically Functionalized with Affinity Domains. *Biomacromolecules.* 2014 May 12;15(5):1696–706.
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 (Mosc).* 2008 Mar 18;47(11):3407–17.
184. Rising A, Widhe M, Johansson J, Hedhammar M. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure–function relationships and biomedical applications. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Jul 29;68(2):169–84.
185. Spieß K, Wohlrab S, Scheibel T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter.* 2010;6(17):4168.
186. Numata K, Subramanian B, Currie HA, Kaplan DL. Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials.* 2009;30(29):5775–84.

187. Yigit S, Tokareva O, Varone A, Georgakoudi I, Kaplan DL. Bioengineered Silk Gene Delivery System for Nuclear Targeting: Bioengineered Silk Gene Delivery System for *Macromol Biosci.* 2014 Sep;14(9):1291–8.
188. Tokareva OS, Glettig DL, Abbott RD, Kaplan DL. Multifunctional spider silk polymers for gene delivery to human mesenchymal stem cells: Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014 Dec;n/a – n/a.
189. Wohlrab S, Müller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, Leal-Egaña A, et al. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials.* 2012 Oct;33(28):6650–9.
190. Bini E, Foo CWP, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL. RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules.* 2006 Nov;7(11):3139–45.
191. Widhe M, Johansson U, Hillerdahl C-O, Hedhammar M. Recombinant spider silk with cell binding motifs for specific adherence of cells. *Biomaterials.* 2013 Nov;34(33):8223–34.
192. Mieszawska AJ, Nadkarni LD, Perry CC, Kaplan DL. Nanoscale Control of Silica Particle Formation via Silk- Silica Fusion Proteins for Bone Regeneration. *Chem Mater.* 2010;
193. Gomes S, Numata K, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL. AFM Study of Morphology and Mechanical Properties of a Chimeric Spider Silk and Bone Sialoprotein Protein for Bone Regeneration. *Biomacromolecules.* 2011 May 9;12(5):1675–85.
194. 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(14):2358–67.
195. Gomes SC, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL. Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials.* 2011 Jun;32(18):4255–66.
196. Jansson R, Thatikonda N, Lindberg D, Rising A, Johansson J, Nygren P-Å, et al. Recombinant Spider Silk Genetically Functionalized with Affinity Domains. *Biomacromolecules.* 2014 May 12;15(5):1696–706.
197. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Self-Assembly of Genetically Engineered Spider Silk Block Copolymers. *Biomacromolecules.* 2009 Feb 9;10(2):229–36.
198. Bini E, Foo CWP, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL. RGD-Functionalized Bioengineered Spider Dragline Silk Biomaterial. *Biomacromolecules.* 2006 Nov;7(11):3139–45.
199. 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 *Euprosthonops australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Mar 18;47(11):3407–17.
200. Hedhammar M, Bramfeldt H, Baris T, Widhe M, Askarieh G, Nordling K, et al. Sterilized recombinant spider silk fibers of low pyrogenicity. *Biomacromolecules.* 2010 Apr 12;11(4):953–9.
201. Xia X-X, Xu Q, Hu X, Qin G, Kaplan DL. Tunable self-assembly of genetically engineered silk--elastin-like protein polymers. *Biomacromolecules.* 2011 Nov 14;12(11):3844–50.
202. 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 (Mosc).* 2004 Oct;43(42):13604–12.
203. Mello CM, Soares JW, Arcidiacono S, Butler MM. Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins. *Biomacromolecules.* 2004 Oct;5(5):1849–52.
204. Lazaris A. Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. *Science.* 2002 Jan 18;295(5554):472–6.
205. Fahnestock SR, Bedzyk LA. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997 Jan;47(1):33–9.

206. Scheller J, Gührs KH, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol.* 2001 Jun;19(6):573–7.
207. Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomaszewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Feb;101A(2):456–64.
208. Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys.* 1997 Aug;30(3):241–77.
209. Kaźmierska K, Florczak A, Piekoś K, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. [Engineered spider silk: the intelligent biomaterial of the future. Part II]. *Postępy Hig Med Dośw Online.* 2011;65:389–96.
210. Stephens JS, Fahnestock SR, Farmer RS, Kiick KL, Chase DB, Rabolt JF. Effects of Electrospinning and Solution Casting Protocols on the Secondary Structure of a Genetically Engineered Dragline Spider Silk Analogue Investigated via Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Biomacromolecules.* 2005 May;6(3):1405–13.
211. Pérez-Rigueiro J, Biancotto L, Corsini P, Marsano E, Elices M, Plaza GR, et al. Supramolecular organization of regenerated silkworm silk fibers. *Int J Biol Macromol.* 2009 Mar;44(2):195–202.
212. Zhou S, Peng H, Yu X, Zheng X, Cui W, Zhang Z, et al. Preparation and Characterization of a Novel Electrospun Spider Silk Fibroin/Poly(D, L-lactide) Composite Fiber. *J Phys Chem B.* 2008 Sep 11;112(36):11209–16.
213. Eisoldt L, Thamm C, Scheibel T. The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers.* 2012 Jun;97(6):355–61.
214. Izdebski T, Akhenblit P, Jenkins JE, Yarger JL, Holland GP. Structure and Dynamics of Aromatic Residues in Spider Silk: 2D Carbon Correlation NMR of Dragline Fibers. *Biomacromolecules.* 2010 Jan 11;11(1):168–74.
215. Huemmerich D, Slotta U, Scheibel T. Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl Phys A.* 2005 Nov 22;82(2):219–22.
216. Slotta U, Tammer M, Kremer F, Koelsch P, Scheibel T. Structural Analysis of Spider Silk Films. *Supramol Chem.* 2006 Jul;18(5):465–71.
217. Metwalli E, Slotta U, Darko C, Roth SV, Scheibel T, Papadakis CM. Structural investigations of thin films of recombinant spider silk.
218. Baoyong L, Jian Z, Denglong C, Min L. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns.* 2010;36(6):891–6.
219. Morgan AW, Roskov KE, Lin-Gibson S, Kaplan DL, Becker ML, Simon CG. Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 2008;29(16):2556–63.
220. Rammensee S, Huemmerich D, Hermanson KD, Scheibel T, Bausch AR. Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Appl Phys A.* 2005 Nov 24;82(2):261–4.
221. Slotta U, Hess S, Spieß K, Stromer T, Serpell L, Scheibel T. Spider Silk and Amyloid Fibrils: A Structural Comparison. *Macromol Biosci.* 2007 Feb 12;7(2):183–8.
222. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci.* 2007 Aug;32(8-9):991–1007.
223. Nazarov R, Jin H-J, Kaplan DL. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules.* 2004 May;5(3):718–26.
224. Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *J Controlled Release*
225. Gellynck K, Verdonk P, Almqvist KF, Van Nimmen E, Gheysens T, Mertens J, et al. Chondrocyte growth in porous spider silk 3D-scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2005;10(Supplement 2).
226. Hermanson KD, Huemmerich D, Scheibel T, Bausch AR. Engineered Microcapsules Fabricated from Reconstituted Spider Silk. *Adv Mater.* 2007 Jul 16;19(14):1810–5.

227. Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*. 2010;31(16):4583–91.
228. Slotta UK, Rammensee S, Gorb S, Scheibel T. An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres. *Angew Chem Int Ed*. 2008 Jun 2;47(24):4592–4.
229. Lammel A, Schwab M, Slotta U, Winter G, Scheibel T. Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres. *ChemSusChem*. 2008 May 23;1(5):413–6.
230. Liebmann B, Hümmerich D, Scheibel T, Fehr M. Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2008 Dec;331(1-2):126–32.
231. Wang G, Siggers K, Zhang S, Jiang H, Xu Z, Zernicke RF, et al. Preparation of BMP-2 Containing Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles Stabilized by Polymer Coating. *Pharm Res*. 2008 Dec;25(12):2896–909.
232. Seidel A, Liivak O, Calve S, Adaska J, Ji G, Yang Z, et al. Regenerated Spider Silk: Processing, Properties, and Structure. *Macromolecules*. 2000 Feb;33(3):775–80.
233. Schacht K, Scheibel T. Controlled Hydrogel Formation of a Recombinant Spider Silk Protein. *Biomacromolecules*. 2011 Jul 11;12(7):2488–95.
234. Agapov II, Pustovalova OL, Moisenovich MM, Bogush VG, Sokolova OS, Sevastyanov VI, et al. Three-dimensional scaffold made from recombinant spider silk protein for tissue engineering. *Dokl Biochem Biophys*. 2009 Jun 18;426(1):127–30.
235. Widhe M, Johansson J, Hedhammar M, Rising A. Current progress and limitations of spider silk for biomedical applications. *Biopolymers*. 2012 Jun;97(6):468–78.
236. Vollrath F, Porter D. Spider silk as a model biomaterial. *Appl Phys A*. 2006 Feb;82(2):205–12.
237. Slotta UK, Rammensee S, Gorb S, Scheibel T. An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres. *Angew Chem Int Ed*. 2008 Jun 2;47(24):4592–4.
238. Rammensee S, Slotta U, Scheibel T, Bausch AR. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(18):6590.
239. Hofer M, Winter G, Myschik J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 2011;
240. Lammel A, Schwab M, Hofer M, Winter G, Scheibel T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*. 2011;32(8):2233–40.
241. Lammel A, Schwab M, Slotta U, Winter G, Scheibel T. Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres. *ChemSusChem*. 2008 May 23;1(5):413–6.
242. Blüm C, Scheibel T. Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles. *BioNanoScience*
243. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Role of Polyalanine Domains in β^2 -Sheet Formation in Spider Silk Block Copolymers. *Macromol Biosci*. 2010 Jan 11;10(1):49–59.
244. Tokareva OS, Lin S, Jacobsen MM, Huang W, Rizzo D, Li D, et al. Effect of sequence features on assembly of spider silk block copolymers. *J Struct Biol*. 2014 Jun;186(3):412–9.
245. Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan DL. Structure–function–property–design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomater* [Internet]. 2013 Aug [cited 2013 Dec 17]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113004121>
246. Florczak A, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Functionalized Spider Silk Spheres As Drug Carriers for Targeted Cancer Therapy. *Biomacromolecules*. 2014 Jul 7;140707071957009.
247. Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility.pdf.
248. Lucke M, Winter G, Engert J. The effect of steam sterilization on recombinant spider silk particles. *Int J Pharm*. 2015 Mar;481(1-2):125–31.

249. Neubauer MP, Blüm C, Agostini E, Engert J, Scheibel T, Fery A. Micromechanical characterization of spider silk particles. *Biomater Sci.* 2013;1(11):1160.
250. Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials.* 2010;31(16):4583–91.
251. Doblhofer E, Scheibel T. Engineering of Recombinant Spider Silk Proteins Allows Defined Uptake and Release of Substances. *J Pharm Sci.* 2014 Dec;n/a – n/a.
252. Mandal BB, Kundu SC. Self-assembled silk sericin/poloxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery. *Nanotechnology.* 2009 Sep 2;20(35):355101.
253. Schacht K, Scheibel T. Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2014 Oct;29:62–9.
254. Hu X, Kaplan D, Cebe P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules.* 2006;39(18):6161–70.
255. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W668–73.
256. Wise DL. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology.* CRC Press; 2000. 904 p.
257. Coburn JM, Kaplan DL. Engineering Biomaterial–Drug Conjugates for Local and Sustained Chemotherapeutic Delivery. *Bioconjug Chem.* 2015 Mar 2;150302152717007.
258. Pritchard EM, Kaplan DL. Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011 Jun;8(6):797–811.
259. Prince JT, McGrath KP, DiGirolamo CM, Kaplan DL. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry (Mosc).* 1995;34(34):10879–85.
260. Gaines WA, Marcotte WR. Recombinant Dragline Silk-Like Proteins-Expression and Purification. *AATCC Rev.* 2011;11(2):75–9.
261. Seib FP, Kaplan DL. Doxorubicin-loaded silk films: Drug-silk interactions and in vivo performance in human orthotopic breast cancer. *Biomaterials.* 2012 Nov;33(33):8442–50.
262. Seib FP, Pritchard EM, Kaplan DL. Self-Assembling Doxorubicin Silk Hydrogels for the Focal Treatment of Primary Breast Cancer. *Adv Funct Mater.* 2013 Jan 7;23(1):58–65.
263. Doblhofer E, Scheibel T. Engineering of Recombinant Spider Silk Proteins Allows Defined Uptake and Release of Substances. *J Pharm Sci.* 2015 Mar;104(3):988–94.
264. Gatenby AA, Viitanen PV, Lorimer GH. Chaperonin assisted polypeptide folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. *Trends Biotechnol.* 1990 Dec;8(12):354–8.
265. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1399–408.
266. Courtenay ES, Capp MW, Record MT. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: Relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible surface area. *Protein Sci.* 2001;10(12):2485–97.
267. Stepanenko OV, Stepanenko OV, Kuznetsova IM, Shcherbakova DM, Verkhusha VV, Turoverov KK. Distinct Effects of Guanidine Thiocyanate on the Structure of Superfolder GFP. *PLoS ONE.* 2012 Listopad;7(11):e48809.
268. Humenik M, Magdeburg M, Scheibel T. Influence of repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins. *J Struct Biol.* 2014 Jun;186(3):431–7.
269. Rising A. Controlled assembly: a prerequisite for the use of recombinant spider silk in regenerative medicine? *Acta Biomater.* 2014 Apr;10(4):1627–31.
270. Hijirida DH, Do KG, Michal C, Wong S, Zax D, Jelinski LW. ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophys J.* 1996 Dec;71(6):3442–7.
271. Jahn TR, Makin OS, Morris KL, Marshall KE, Tian P, Sikorski P, et al. The common architecture of cross-beta amyloid. *J Mol Biol.* 2010 Jan 29;395(4):717–27.

272. Neubauer MP, Blüm C, Agostini E, Engert J, Scheibel T, Fery A. Micromechanical characterization of spider silk particles. *Biomater Sci.* 2013;1(11):1160.
273. Phelps C f. Dynamic light scattering, with application to chemistry, biology and physics: B. J. Berne & R. Pecora. Pp. 376. John Wiley 1976. £14.00 or \$27.00. *Biochem Educ.* 1977 Jan 1;5(1):22–22.
274. Helfricht N, Klug M, Mark A, Kuznetsov V, Blüm C, Scheibel T, et al. Surface properties of spider silk particles in solution. *Biomater Sci.* 2013;1(11):1166.
275. Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan DL. Structure–function–property–design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomater*
276. Xu M, Lewis RV. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(18):7120–4.
277. Hu X, Vasanthavada K, Kohler K, McNary S, Moore AMF, Vierra CA. Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Jul 4;63(17):1986–99.
278. Lewis RV. Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. *Chem Rev.* 2006 Sep;106(9):3762–74.
279. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Role of Polyalanine Domains in β -Sheet Formation in Spider Silk Block Copolymers. *Macromol Biosci.* 2010 Jan 11;10(1):49–59.
280. Jenkins JE, Creager MS, Lewis RV, Holland GP, Yarger JL. Quantitative Correlation between the Protein Primary Sequences and Secondary Structures in Spider Dragline Silks. *Biomacromolecules.* 2010 Jan 11;11(1):192–200.
281. M. Cieplak, A. Sienkiewicz "Białka", Encyklopedia fizyki współczesnej. Państwowe Wydawn. Nauk.; 1983. 1007 p.
282. Blüm C, Scheibel T. Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles. *BioNanoScience* [Internet]. 2012 Feb 2 [cited 2012 May 10]; Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12668-012-0036-7>
283. Gramatyka M. [Cardiotoxicity as undesired side effect in the treatment of breast cancer]. *Postępy Hig Med Dośw Online.* 2014;68:483–97.
284. Keefe DL. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol.* 2001 Aug;28(4 Suppl 12):2–7.
285. Gabizon A, Isacson R, Libson E, Kaufman B, Uziely B, Catane R, et al. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncol Stockh Swed.* 1994;33(7):779–86.
286. 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. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2000 Aug;11(8):1029–33.
287. S C, A R, B M. Recent trends in drug delivery systems: liposomal drug delivery system--preparation and characterisation. *Indian J Exp Biol.* 1997 Aug;35(8):801–9.
288. Hande KR. Topoisomerase II inhibitors. *Update Cancer Ther.* 2008 Mar;3(1):13–26.
289. Laginha KM. Determination of Doxorubicin Levels in Whole Tumor and Tumor Nuclei in Murine Breast Cancer Tumors. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 1;11(19):6944–9.
290. Enache M, Volanschi E. Spectroscopic investigations of the molecular interaction of anticancer drug mitoxantrone with non-ionic surfactant micelles. *J Pharm Pharmacol.* 2012 May;64(5):688–96.
291. Seib FP, Coburn J, Konrad I, Klebanov N, Jones GT, Blackwood B, et al. Focal therapy of neuroblastoma using silk films to deliver kinase and chemotherapeutic agents in vivo. *Acta Biomater*
292. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Controlled Release.* 2001 Jun 15;73(2–3):121–36.
293. Seib FP, Jones GT, Rnjak-Kovacina J, Lin Y, Kaplan DL. pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Adv Healthc Mater.* 2013 Dec;2(12):1606–11.

294. Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 1989;49(16):4373–84.
295. Numata K, Hamasaki J, Subramanian B, Kaplan DL. Gene delivery mediated by recombinant silk proteins containing cationic and cell binding motifs. *J Controlled Release.* 2010;146(1):136–43.
296. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc.* 2012 Feb 1;134(4):2139–47.
297. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2718.
298. Kundu J, Chung Y-I, Kim YH, Tae G, Kundu SC. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int J Pharm.* 2010 Mar;388(1-2):242–50.
299. Zhang H, Li L, Dai F, Zhang H, Ni B, Zhou W, et al. Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *J Transl Med.* 2012;10(1):117.
300. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2005 Jan;26(2):147–55.
301. Cui X, Wen J, Zhao X, Chen X, Shao Z, Jiang JJ. A pilot study of macrophage responses to silk fibroin particles. *J Biomed Mater Res A.* 2013 May;101A(5):1511–7.
302. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin H-J, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials.* 2003 Aug;24(18):3079–85.