

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki
i Biofizyki Medycznej

Monika Marcinkowska

Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem monoklonalnym w badaniach in vitro

PAMAM G4 dendrimer conjugates with anti-cancer drugs
and monoclonal antibody - in vitro studies

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor:

- prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

Promotor pomocniczy:

- dr hab. Anna Janaszewska

Pragnę wyrazić szczególną wdzięczność Pani prof. dr hab. Barbarze Klajnert-Maculewicz za wszechstronną pomoc udzielaną mi podczas powstawania tej pracy, a także za życzliwość i wyrozumiałość okazywaną mi podczas całych moich studiów doktoranckich.

Dziękuję również Pani dr hab. Annie Janaszewskiej za nieocenioną pomoc w poszukiwaniu rozwiązań problemów powstających podczas realizacji pracy badawczej oraz otwarty umysł i wiele cierpliwości okazywanej mi w trakcie całego toku trwania studiów doktoranckich.

Wyrazy wdzięczności składam pracownikom oraz doktorantom Katedry Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za przyjazną atmosferę pracy i merytoryczną pomoc w trakcie wykonywania moich badań.

Badania w niniejszej pracy doktorskiej prowadzone były w ramach projektów:



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt „Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych naukowców nauk przyrodniczych i technologicznych – D-RIM BIO”, współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, nr UDA-POKL.08.02.01-10-010/13-00.



Projekt Preludium 10 „Koniugaty nanocząstek z przeciwciałem monoklonalnym – nowe otwarcie w celowanej terapii przeciwnowotworowej”, UMO-2015/19/N/NZ3/02942.

Kierownik: mgr Monika Marcinkowska



COST Action CA17140 „Nano2Clinic. Cancer Nanomedicine – from the bench to the bedside”,



**Ministerstwo
Nauki
i Szkolnictwa
Wyższego**

Indywidualne stypendia (lata: 2016, 2017, 2018) stanowiące dofinansowanie badań w tematyce: „Koniugaty dendrymeru PAMAM G4, leków przeciwnowotworowych i przeciwciała monoklonalnego – trastuzumab” (Rozporządzenie MNiSW z 5 listopada 2010 r.).

Współpraca naukowa:



Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk
w Łodzi

dr hab. Arkadiusz Chworoś



Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im.
M. Kopernika w Łodzi

dr n. med. Maciej Stańczyk

Spis treści

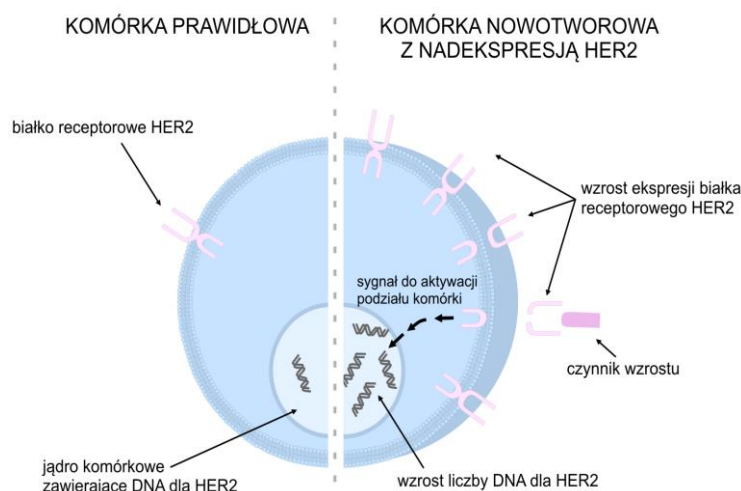
1. Wprowadzenie	5
2. Cel pracy	8
3. Materiały i metody	9
3.1. Synteza i charakterystyka koniugatów	9
3.2. Ocena cytotoksyczności i selektywności koniugatów	10
3.3. Ocena szybkości wnikania koniugatów i ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej ..	11
3.4. Porównanie mechanizmów działania wybranych koniugatów	12
4. Podsumowanie	16
5. Dorobek naukowy	17
6. Streszczenie w języku polskim	23
7. Streszczenie w języku angielskim	25

Załączniki

1. Publikacje naukowe stanowiące rozprawę doktorską
2. Oświadczenia współautorów

1. Wprowadzenie

Rak piersi to nowotwór, który obok raka jajnika oraz macicy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet. U prawie 30% pacjentek z rakiem piersi, potwierdzono również nadekspresję receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) na powierzchni komórek nowotworowych¹. Gen ERBB2 kodujący białko HER2 jest protoonkogenem, którego zwielokrotnienie (amplifikacja) leży u podstaw nadmiernej ekspresji białka HER2 w komórkach nowotworowych. Liczne badania wskazują, iż ponad 30% przypadków raka piersi ma zbyt wiele kopii genu ERBB2, czego rezultatem jest nadekspresja receptora HER2^{2,3}. Anomalia ta prowadzi do intensywniejszego wzrostu nowotworu i agresywniejszego przebiegu choroby. Niestety nowotwory z nadekspresją receptora HER2 charakteryzują się również większą lekoopornością⁴. Liczba kopii genu ERBB2 pozwala ocenić szanse pacjentki na wyleczenie. Następstwem zwiększenia liczby receptorów HER2 na powierzchni komórki jest ekspresja białek mających swój udział w procesie proliferacji i migracji komórek oraz zapoczątkowaniu procesu angiogenezy, prowadzącego do powstania przerzutów⁵. Rysunek 1 przedstawia mechanizm działania i nadekspresji receptora HER2 w komórce.



Rysunek 1. Mechanizm działania i nadekspresji receptora HER2 w komórce⁶.

¹ Bishop J.M. Annu. Rev. Biochem., 1983; 52: 301-354

² Borg A et al. Cancer Res., 1990; 50: 4332-4337

³ Slamon D.J. et al. Science, 1987; 235: 177-182

⁴ Tang Y. et al. FASEB J., 2014; 28 (Suppl.): 58.6

⁵ Margolis B.L. et al. J. Biol. Chem., 1989; 264: 10667-10671

⁶ Marcinkowska M. et al. Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej. 2015, 69, 1313-1324

Trastuzumab jest rekombinowanym, humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym (mAb, Monoclonal Antibody) klasy IgG1 selektywnie łączącym się z receptorem EGFR2. Po związaniu się z IV domeną zewnątrzkomórkowej części białka HER2, trastuzumab blokuje receptor powodując zahamowanie nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych. Uważa się, iż zahamowanie proliferacji jest efektem zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1^{7,8}.

Liczne doniesienia literaturowe oraz kilka badań klinicznych m.in.: NOAH, German Breast Group i MD. Anderson Cancer Center potwierdzają wysoką skuteczność chemioterapii prowadzonej przez 6 miesięcy z zastosowaniem trastuzumabu⁹. Uzyskano od 37% do 65% remisji całkowitych, oznaczających całkowitą patologiczną remisję. Niektóre opracowania pokazują, iż włączenie do terapii trastuzumabu może nawet podwoić odsetek całkowitych remisji, w porównaniu do leczenia wyłącznie chemioterapeutykami. Zastosowanie przeciwciała monoklonalnego trastuzumab w terapii HER2(+) raka piersi przyniosło zatem duży przełom. Dlatego American Cancer Society zaleca leczenie neoadiuwantowe paklitakselem w połączeniu z trastuzumabem oraz leczenie cyklofosfamidem z trastuzumabem poprzedzone przez podanie 5-fluorouracylu z epirubicyną.

Niestety występująca oporność na trastuzumab, o dotychczas niewyjaśnionej etiologii, jest częstą przyczyną przerwania leczenia. Słabym punktem terapii anty-HER2 z użyciem trastuzumabu są jego działania niepożądane. Uszkodzenie serca występujące wskutek leczenia trastuzumabem stanowi niejednokrotnie przeciwwskazanie do kontynuacji leczenia^{10,11}. Kardi toksyczność trastuzumabu skłania do modyfikowania terapii opartych na nim. Ponadto, wcześniejsze badania mające na celu ocenę synergistycznego działania przeciwciała podawanego z paklitakselem lub docetakselem potwierdziły zaledwie addytywny wpływ stosowania leków i przeciwciała na badane linie komórkowe MCF-7, MDA-MB453 i SK-BR3¹².

Opracowanie skutecznego, selektywnie toksycznego dla komórek nowotworowych i taniego leku przeciwnowotworowego określa nowe kierunki badań w onkologii. Dobrze udokumentowane wyniki zastosowania dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych¹³ stanowią podstawę do użycia ich jako elementu łączącego przeciwciało monoklonalne trastuzumab i leki przeciwnowotworowe. Utworzenie koniugatów trastuzumab-dendrymer-lek ma kilka podstawowych i istotnych zalet tj. stopniowe uwalnianie

⁷ Hurrell T. et al. Cancer Cell Int., 2013; 13: 97

⁸ Kim J.W. et al. Gynecol. Oncol., 1996; 60: 283-287

⁹ Gianni L. et al. Lancet Oncol., 2014; 15: 640-647

¹⁰ Milani A. et al. Ann Oncol., 2013; 24: 1740-1748

¹¹ Slamon D.J. et al. N. Engl. J. Med., 2001; 344: 783-792

¹² Merlin J.L. et al. Ann. Oncol., 2002; 13: 1743-174

¹³ Esfand R. et al. Drug Discov. Today, 2001; 6: 427-436

leku i ochronę przed zbyt szybką transformacją w wątrobie, co pozwala na redukcję dawki przy zachowaniu efektu terapeutycznego¹⁴ oraz bezpośrednio uwalnianie leku w środowisku guza, co pozwala uniknąć toksycznego działania wobec komórek prawidłowych (szczególnie kardiotoxyczności występującej u pacjentek przyjmujących antracykliny czy nefrotoxyczności wywoływanej taksanami). Zastosowanie koniugatu umożliwia także zaprzestanie używania toksycznych rozpuszczalników oraz leków antyhistaminowych stosowanych podczas leczenia taksanami^{15,16}. Ponadto dołączony do powierzchni dendrymeru związanego z lekiem trastuzumab powinien zapewnić wydajny transport leku do wnętrza komórek z nadekspresją HER2.

Inspiracją dla niniejszej pracy była potrzeba zwiększenia efektywności i selektywności działania wobec komórek nowotworowych powszechnie stosowanych chemioterapeutyków w terapii raka piersi szczególnie z nadekspresją HER2. W oparciu o obiecujące, wstępne wyniki przebadano w tym celu szeroką grupę dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM), posiadających zdolność transportu leków do komórek nowotworowych i wyłoniono dendrymery PAMAM generacji 4 zawierające 64 terminalne grupy aminowe jako najskuteczniejsze systemy transportujące antracykliny i taksany. Zsyntezowano koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi: doksorubicyną (dox), paklitakselem (ptx) oraz docetakselem (doc). Koniugaty te wykazały większą cytotoxyczność wobec komórek nowotworowych w porównaniu z wolnymi lekami.

¹⁴ Barratt G.M. Pharm. Sci. Technol. Today, 2000; 3: 163-171

¹⁵ Byrne J.D. et al. Adv. Drug Deliv. Rev., 2008; 60: 1615-1626

¹⁶ Talekar M. et al. Anticancer Drugs, 2011; 22: 949-962

2. Cel pracy

Celem pracy było przebadanie szerokiej grupy koniugatów dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) z lekami z grupy antracyklin (doksorubicyna) i taksanów (docetaksel i paklitaksel) w poszukiwaniu najefektywniej działającego systemu przeciwnowotworowego, który dzięki przyłączonemu przeciwciału monoklonalnemu (trastuzumab) posiadałby zdolność selektywnego działania w terapii raka piersi z nadekspresją HER2.

Hipoteza badawcza zakłada, iż koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi okażą się skuteczniejsze niż wolne leki. Ponadto dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewni selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją HER2.

3. Materiały i metody

W pracy wyróżnić można część chemiczną oraz badania *in vitro*. Praca obejmowała cztery zadania badawcze: (1) syntezę i charakterystykę koniugatów dendrymeru PAMAM, generacji 4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem monoklonalnym – trastuzumabem; (2) ocenę cytotoksyczności i selektywności koniugatów wobec komórek nowotworowych raka piersi HER-2 negatywnych i pozytywnych; (3) ocenę szybkości wnikania koniugatów i ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej; (4) zbadanie mechanizmów działania wybranych koniugatów.

Do osiągnięcia założonych celów użyto: niemodyfikowanego dendrymeru PAMAM generacji czwartej, chlorku doksorubicyny, paklitakselu i docetakselu oraz rozpuszczalników niezbędnych do przeprowadzenia syntezy pochodzących z firmy Sigma-Aldrich (Polska). Herceptin (trastuzumab) został подарowany przez firmę Roche (Polska) na podstawie porozumienia podpisanego z dr n. med. Maciejem Stańczykiem. Do badań wybrano dwie linie komórkowe raka piersi: HER-2 negatywną (MCF-7 ATCC no. HTB-22) and HER-2 pozytywną (SKBR-3 ATCC no. HTB-30) zakupione w firmie ATCC (LGC Standards Sp. z o. o., Polska). Pozostałe główne odczynniki zakupiono w Sigma-Aldrich (MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenylotetrazolu), PI (jodek propidyny), rybonukleaza A –), w Molecular Probes (USA) (sonda JC-1) oraz w BD Biosciences (USA) – (H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceina), AnnexinV (aneksyna V)), zaś kity (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay i Caspase-Glo® 9 Assay) w Promega Corporation (Poland).

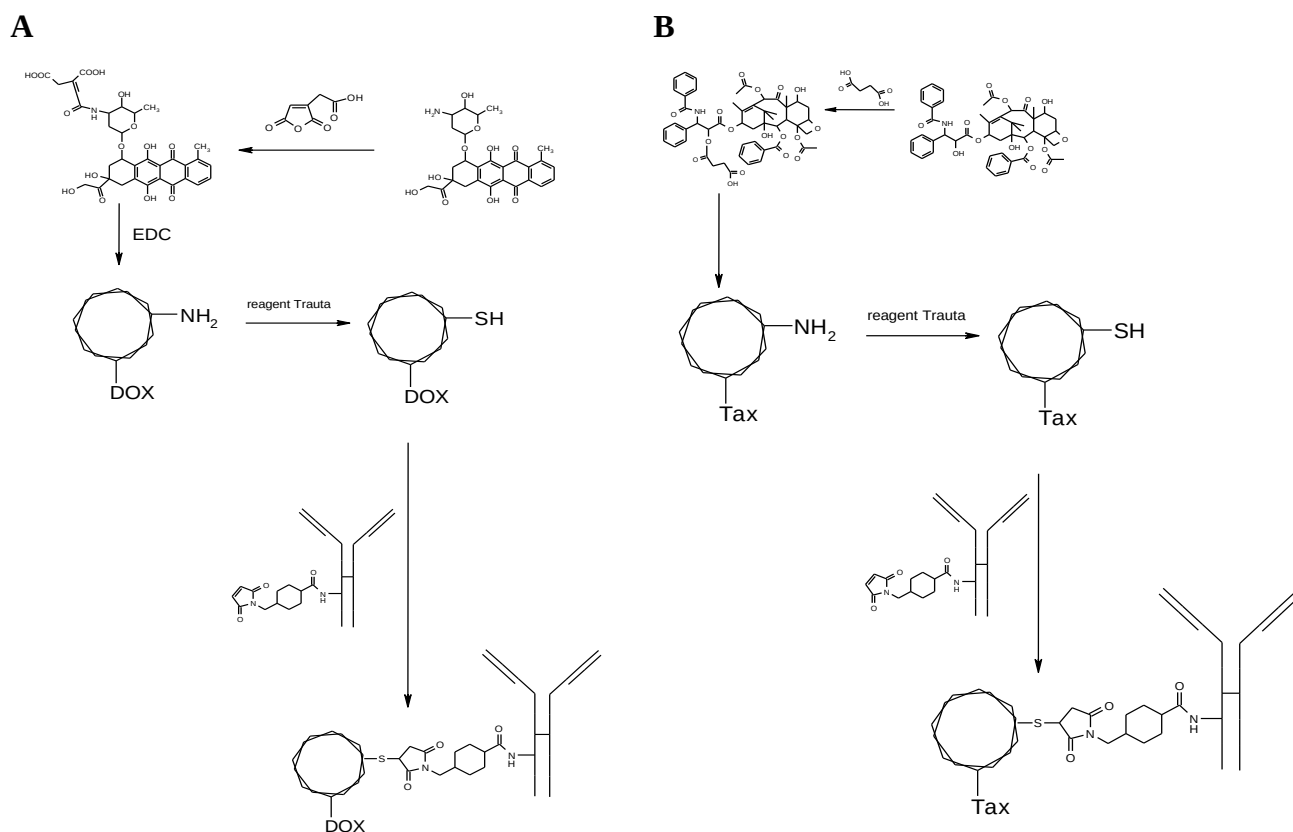
3.1. Synteza i charakterystyka koniugatów

Zsyntezowano koniugaty dendrymeru PAMAM generacji 4 z (1) docetakselem; (2) paklitakselem; (3) doksorubicyną; (4) trastuzumabem oraz koniugaty tego dendrymeru i leków z przeciwciałem monoklonalnym (5) PAMAM-docetaksel-trastuzumab; (6) PAMAM-paklitaksel-trastuzumab; (7) PAMAM-doksorubicyna-trastuzumab. Zastosowanie technik ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR oraz RP-HPLC potwierdziło czystość otrzymanych koniugatów a także umożliwiło dokonanie ich charakterystyki.

Aby otrzymać koniugat dendrymer-doksorubicyna (antracyklina), zastosowano wieloetapową reakcję wg schematu przedstawionego na rysunku 2A¹⁷. W pierwszej kolejności dokonano modyfikacji pierścienia aminocukrowego doksorubicyny cząsteczkami bezwodnika *cis*-akoniowego. Następnym krokiem było połączenie (za pomocą wiązania amidowego) leku

¹⁷ Marcinkowska, M. et al. Polymers. 2018, 10 (2), 187

z powierzchnią dendrymeru. Dalsze etapy reakcji miały na celu kowalencyjne związanie przeciwciała monoklonalnego z powierzchnią dendrymeru. Aby sprzęgnąć trastuzumab z dendrymerem PAMAM wykorzystano specjalnie wyselekcjonowaną cząsteczkę łączącą (linker) posiadającą na swoich końcach grupy funkcyjne wchodzące w reakcję zarówno z grupami tiolowymi na powierzchni trastuzumabu jak i z grupami aminowymi dendrymeru. W tym celu wprowadzono grupę –SH na powierzchnię dendrymeru, przy zastosowaniu odczynnika Trauta, aby docelowo dołączyć przeciwciało monoklonalne, uprzednio sprzęgnięte z cząsteczką łącznika. Analogicznie, aby otrzymać koniugat dendrymer-taksan (paklitaksel, docetaksel), zastosowano wieloetapową reakcję wg schematu przedstawionego na rysunku 2B¹⁸.



Rysunek 2. Schemat syntezy koniugatu (A) PAMAM-dox-trastuzumab¹⁷ i (B) PAMAM-taksan-trastuzumab¹⁸.

Po modyfikacji cząsteczkami kwasu bursztynowego grupy hydroksylowej należącej do taksanu za pomocą wiązania amidowego, lek był dołączany do powierzchni dendrymeru. Kolejne etapy reakcji miały na celu kowalencyjne związanie przeciwciała monoklonalnego z powierzchnią dendrymeru.

¹⁸ Marcinkowska, M. et al. Pharm. Res. 2019, 36: 154

3.2. Ocena cytotoksyczności i selektywności koniugatów

Kolejnym etapem pracy była ocena cytotoksyczności koniugatów oraz sprawdzenie czy koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi działają efektywniej niż wolne leki oraz czy dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewnia selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją receptora HER2 na powierzchni błony komórkowej. Do badań użyto dwie linie komórkowe raka piersi: HER-2 negatywną (MCF-7) and HER-2 pozytywną (SKBR-3).

Wartości parametru IC_{50} wyznaczone dla linii raka piersi HER2 – negatywnej (MCF-7) i HER2 – pozytywnej (SKBR-3) wykazały zgodny z danymi literaturowymi wzrost cytotoksyczności koniugatów PAMAM-lek oraz, co istotne, koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab, w porównaniu z wolnym lekiem. Jednak najważniejszym rezultatem była różnica w toksyczności koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab obserwowana między liniami komórkowymi. Zwłaszcza koniugat z docetakselem wykazywał wyjątkowo wysoką toksyczność wobec komórek SKBR-3 i niską toksyczność wobec komórek MCF-7. W Tabeli 1 porównano wartości IC_{50} dla koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab i wolnych leków, po 24 i 48 godzinach inkubacji^{17,18}.

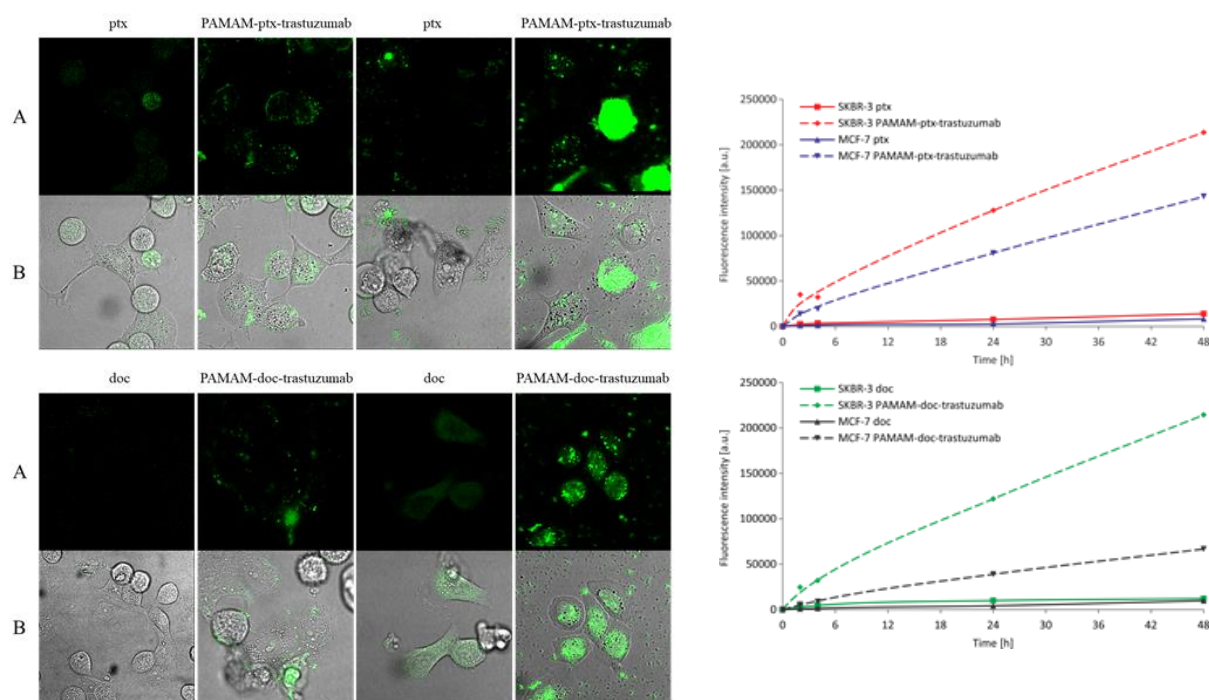
Tabela 1. Zestawienie wartości IC_{50} dla koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab i wolnych leków.

	MCF-7 24h	MCF-7 48h	SKBR-3 24h	SKBR-3 48h
Dox	9,20 ± 1,23	1,10 ± 1,23	0,77 ± 0,16	0,34 ± 0,13
PAMAM-dox-trastuzumab	38,40 ± 5,73	14,86 ± 5,37	2,81 ± 0,74	0,003 ± 0,002
Ptx	7,82 ± 0,18	2,24 ± 0,33	7,31 ± 1,54	0,49 ± 0,13
PAMAM-ptx-trastuzumab	0,585 ± 0,18	0,09 ± 0,01	0,72 ± 0,21	0,002 ± 0,001
Doc	23,76 ± 4,81	9,19 ± 3,36	10,75 ± 1,50	2,00 ± 0,44
PAMAM-doc-trastuzumab	>100	48,85 ± 4,82	2,03 ± 0,07	0,004 ± 0,002

3.3. Ocena szybkości wnikania koniugatów i ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono ocenę szybkości wnikania wolnych leków i koniugatów do komórek stosując cytometrię przepływową. Stwierdzono, iż wyniki cytotoksyczności uzyskane testem MTT są rezultatem szybszego wnikania leków związanych

z nośnikiem – dendrymerem PAMAM. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwiło potwierdzenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych związków. Przedstawione zdjęcia konfokalne ilustrują akumulację koniugatów paklitakselu i docetakselu z dendrymerem PAMAM oraz trastuzumabem w komórkach HER2 – pozytywnych (SKBR-3) (Rysunek 3) i są dowodem na wyjątkowo selektywne działania tych koniugatów¹⁸ w porównaniu do koniugatu z doksorubicyną¹⁷.



Rysunek 3. Lewy panel: zdjęcia konfokalne wewnątrzkomórkowej lokalizacji paklitakselu (ptx), docetakselu (doc) oraz ich koniugatów PAMAM-ptx-trastuzumab i PAMAM-doc-trastuzumab dla linii raka piersi SKBR-3 HER2 – pozytywnej i MCF-7 HER2 – negatywnej (A – kanał zielony, B – widok w świetle przechodzącym). Prawy panel: wykresy ilustrujące szybkość transportu wolnych leków i ich koniugatów do komórek obu linii¹⁸.

3.4. Porównanie mechanizmów działania wybranych koniugatów

Aby wyłonić układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 dokonano porównania mechanizmów działania najbardziej selektywnych koniugatów dendrymeru PAMAM z taksanami i trastuzumabem. W tym celu oznaczono poziom reaktywnych form tlenu, zmiany potencjału mitochondrialnego, aktywację kaspaz, indukcję apoptozy i rozkład faz cyklu komórkowego.

Zarówno wolne leki, jak i ich koniugaty, zwiększały poziom reaktywnych form tlenu w komórkach obu linii. Koniugaty z przeciwciałem monoklonalnym działały wolniej, a efekty ich działania były obserwowane dopiero po 24 godzinach a nie po 3 godzinach, jak

w przypadku wolnych leków¹⁹. Jest to pierwsza zaobserwowana różnica w działaniu wolnych leków i ich koniugatów z trastuzumabem.

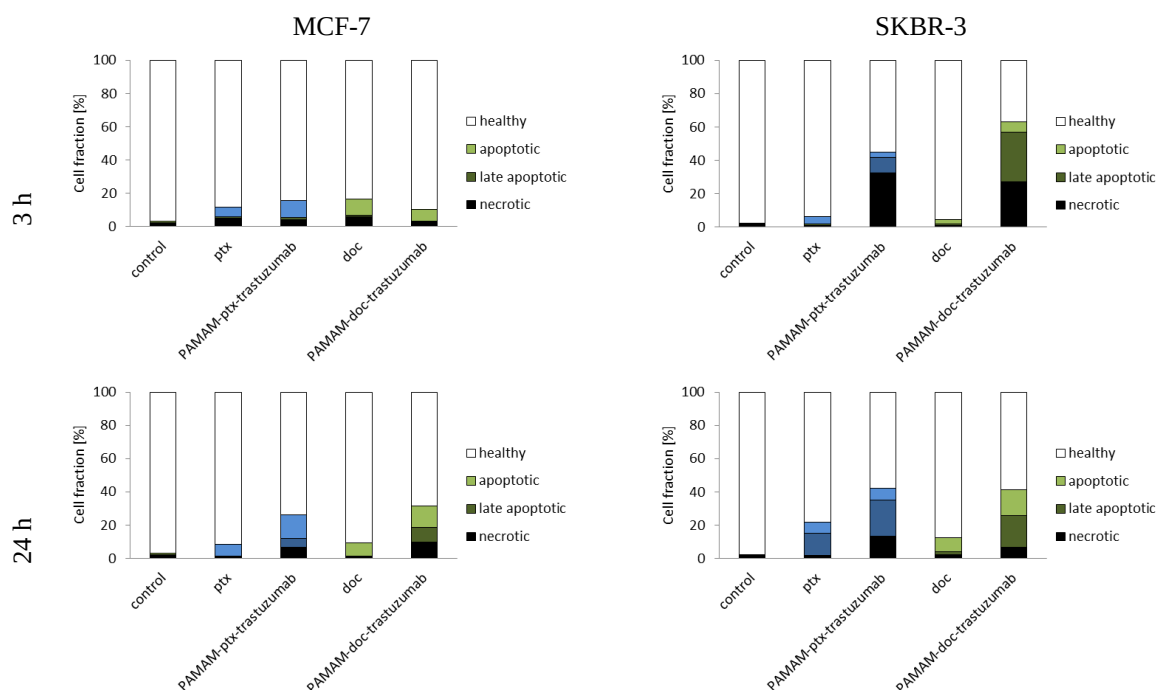
Uważa się, iż zmiany potencjału mitochondrialnego związane są bezpośrednio ze wzrostem poziomu wolnych rodników w komórce. Uzyskane wyniki zmiany potencjału mitochondrialnego dla wolnych leków i ich koniugatów były potwierdzeniem i uzupełnieniem wcześniejszych obserwacji zmian poziomu wolnych rodników¹⁹. Na tym etapie badań pojawiła się hipoteza robocza, że o ile koniugaty dendrymeru PAMAM i leków mają podobny mechanizm działania jak wolne leki, o tyle dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zmienia mechanizm działania koniugatu, szczególnie w przypadku efektywniejszych i bardziej selektywnych koniugatów z taksanami. Koniugat PAMAM-ptx-trastuzumab działał podobnie do wolnych leków, początkowo wywołując wzrost, a następnie spadek potencjału błony mitochondrialnej, w przeciwieństwie do koniugatu PAMAM-doc-trastuzumab, który wywołał natychmiastową depolaryzację mitochondriów. Co ciekawe, w przypadku linii komórkowej SKBR-3 oba koniugaty powodowały bardzo dużą depolaryzację mitochondriów, szczególnie po 24-godzinnej inkubacji.

Ponieważ taksany aktywują szlaki przekazywania sygnałów prowadzących do apoptozy, przeprowadzono równoległe cytometryczne chemiluminescencyjne oznaczenia aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9 oraz oznaczenia indukcji apoptozy z zastosowaniem aneksyny V i jodku propidyny. Oznaczenia aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9 potwierdziły, iż oba koniugaty PAMAM-lek-trastuzumab w linii komórkowej MCF-7 powodują spadek aktywności wszystkich kaspaz po osiągnięciu początkowego maksimum, natomiast w linii komórkowej SKBR-3 koniugaty powodują wzrost aktywności wszystkich kaspaz¹⁹. Co ciekawe, przypadku linii SKBR-3 oba koniugaty PAMAM-lek-trastuzumab działały podobnie do wolnych leków aktywując kaspazy inicjujące -8 i -9, które uczestnicząc w aktywacji kaskady kaspaz – prowadziły do aktywacji kaspazy -3, niezbędnej do cięcia większości substratów w komórce, a także fragmentacji DNA i rozpadu jądra, powodujących śmierć komórki na drodze apoptozy.

Ponieważ uzyskane wyniki mogą wskazywać, iż apoptoza indukowana przez koniugaty PAMAM-lek-trastuzumab w linii komórkowej SKBR-3 HER2 – pozytywnej jest związana ze szlakiem zależnym od kaspaz, kolejnym etapem badań była analiza frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Przeprowadzona analiza potwierdziła przypuszczenia, iż koniugaty z trastuzumabem znacznie w większym stopniu i szybciej indukują apoptozę w komórkach HER2 – pozytywnych (Rysunek 4) niż w HER2 – negatywnych¹⁹. Uzyskane wyniki pokazały również, iż koniugat PAMAM-ptx-trastuzumab powoduje nekrozę

¹⁹ Marcinkowska, M. et al. *Polymers*. 2019, 11(9), 1422

w większym stopniu niż koniugat PAMAM-doc-trastuzumab, co potwierdza odmienny mechanizm działania obu koniugatów.



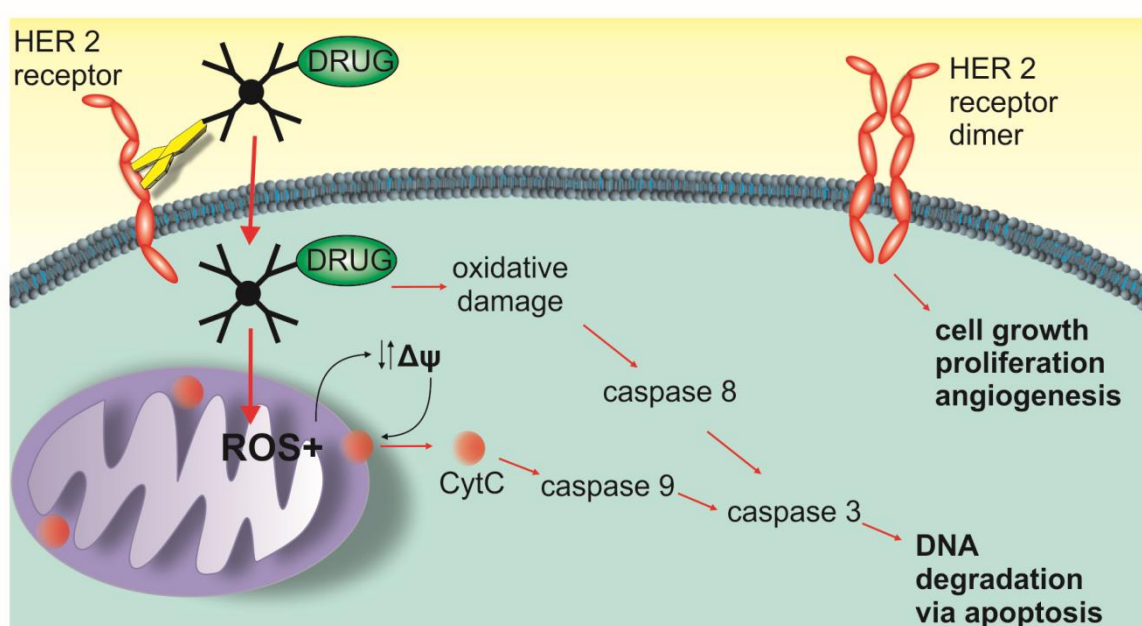
Rysunek 4. Wpływ paklitakselu (ptx), docetakselu (doc) oraz ich koniugatów PAMAM-ptx-trastuzumab i PAMAM-doc-trastuzumab na frakcje komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w linii raka piersi SKBR-3 HER2 – pozytywnej i MCF-7 HER2 – negatywnej po 3 i 24 godzinach inkubacji¹⁹.

Zaobserwowane zjawisko potwierdzono stosując mikroskopię konfokalną. Wykonane zdjęcia pokazały, iż po 24-godzinny okresie inkubacji oba koniugaty PAMAM-lek-trastuzumab powodują liczne zmiany typowe dla apoptozy, chociaż koniugaty PAMAM-ptx-trastuzumab powoduje również charakterystyczne zmiany dla nekrozy tj.: zmianę struktury, wielkości i kształtu jądra komórkowego, kondensację chromatyny, obkurczenie komórek i fragmentację jąder, tworzenie ciałek apoptotycznych oraz rozpad komórek¹⁹.

Oprócz generowania stresu oksydacyjnego i indukcji apoptozy, innym aspektem działania leków przeciwnowotworowych jest wpływ na cykl komórkowy. Dlatego ostatnim etapem badań była analiza faz cyklu komórkowego. W przypadku linii komórkowej SKBR-3 po 3-godzinny okresie inkubacji, tylko koniugat PAMAM-doc-trastuzumab powodował istotną akumulację komórek w fazie G1. Po 24-godzinnej inkubacji paklitaksel i docetaksel zwiększały akumulację komórek w fazie S (nieznacznie) i w fazie G2 / M (istotnie), podczas gdy koniugat PAMAM-ptx-trastuzumab powodował zatrzymanie cyklu komórkowego

w fazach G1 i S (odpowiednio 57,6 % i 42,3%), a koniugat PAMAM-doc-trastuzumab powodował jedynie zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (72,5%). Przeprowadzona analiza faz cyklu komórkowego pokazała, iż koniugaty nie hamują skutecznego działania trastuzumabu, a połączenie z taksanami wzmacnia ich działanie.

Przeprowadzone badania pokazują złożoność mechanizmu cytotoksycznego działania koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab. Wyróżnić można trzy główne sposoby ich działania (Rysunek 5). Pierwszy mechanizm to stres oksydacyjny, który prowadzi do powstawania wolnych rodników, drugi - to mitochondrialna aktywacja kaskady kaspaz i trzeci mechanizm jest związany z blokowaniem receptora HER2.



Rysunek 5. Schemat działania koniugatów PAMAM-ptx-trastuzumab i PAMAM-doc-trastuzumab¹⁹.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyłoniono również układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2. Jest nim koniugat PAMAM-doc-trastuzumab.

Sposób otrzymywania koniugatu docetakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 oraz ich zastosowanie do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi zostały zgłoszone do ochrony patentowej (P.420273, P.420274)

4. Podsumowanie

- Potwierdzono hipotezę badawczą, iż koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi działają skuteczniej niż wolne leki, a dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewnia selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją receptora HER2 na powierzchni błony komórkowej.
- Pomyślnie przeprowadzono syntezę koniugatów dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi: (1) PAMAM-doksorubicyna, (2) PAMAM-paklitaksel, (3) PAMAM-docetaksel, oraz koniugatów z przyłączonym kowalencyjnie przeciwciałem monoklonalnym: (4) PAMAM-doksorubicyna-trastuzumab, (5) PAMAM-paklitaksel-trastuzumab, (6) PAMAM-docetaksel-trastuzumab, (7) PAMAM-trastuzumab. Koniugaty scharakteryzowano za pomocą technik ^1H NMR, ^{13}C NMR, FTIR oraz RP-HPLC.
- Dokonano oceny cytotoksyczności koniugatów (testem MTT) i wyznaczono parametr IC_{50} dla dwóch linii komórek raka piersi SKBR-3 HER2-pozytywnej i MCF-7 HER2-negatywnej. Uzyskane wyniki potwierdziły selektywność koniugatów dendrymeru PAMAM z lekami i trastuzumabem względem komórek z nadekspresją receptora HER2.
- Określono szybkość wnikania koniugatów do komórek nowotworowych oraz, przy zastosowaniu techniki mikroskopii konfokalnej, potwierdzono ich lokalizację w komórkach.
- Porównano mechanizm działania najbardziej selektywnych koniugatów dendrymeru PAMAM z taksanami i trastuzumabem. Zbadano ich wpływ na powstawanie reaktywnych form tlenu, zmiany potencjału mitochondrialnego, aktywację kaspaz, indukcję apoptozy oraz rozkład faz cyklu komórkowego.
- Na podstawie badań wyłoniono układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 – koniugat PAMAM-docetaksel-trastuzumab.
- Wyniki badań opublikowano w trzech pracach doświadczalnych z listy JCR, prezentowano na licznych konferencjach naukowych zarówno krajowych, jak i zagranicznych. Ponadto w oparciu o uzyskane wyniki powstały dwa zgłoszenia patentowe (P.420273, P.420274). Opublikowano też jedną pracę przeglądową z tematyki rozprawy doktorskiej. Temat pracy doktorskiej był przedmiotem zakończonego grantu NCN PRELUDIUM.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. **Marcinkowska, M.**, Stanczyk, M., Janaszewska, A., Gajek, A., Ksiezak, M., Działak, P., Klajnert-Maculewicz, B. Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody. *Polymers*. 2019, 11(9), 1422. IF 3,681; 100 pkt. MNiSW (opublikowany po 31 lipca 2019 r.)
2. **Marcinkowska, M.**, Stanczyk, M., Janaszewska, A., Sobierajska, E., Chworoś, A., Klajnert-Maculewicz, B. Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy. *Pharmaceutical Research*. 2019, 36: 154. IF 3,896; 40 pkt. MNiSW
3. **Marcinkowska, M.**, Sobierajska, E., Stanczyk, M., Janaszewska, A., Chworoś, A., Klajnert-Maculewicz, B. Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody – trastuzumab: The new approach of a well-known strategy. *Polymers*. 2018, 10 (2), 187. IF 3,681; 40 pkt. MNiSW
4. **Marcinkowska, M.**, Stańczyk, M., Klajnert-Maculewicz, B. Przeciwciało monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2015, 69, 1313-1324. IF 0,633; 15 pkt. MNiSW

Dla rozprawy doktorskiej: **IF = 11,891; 95 pkt. MNiSW** dla artykułów opublikowanych przed 31.07.2019; **100 pkt. MNiSW** dla artykułu opublikowanego po 31.07.2019.

Całkowity dorobek: **IF = 48,614; 355 pkt. MNiSW** dla artykułów opublikowanych przed 31.07.2019; **200 pkt. MNiSW** dla artykułów opublikowanych po 31.07.2019.

Pozostałe publikacje

5. Janaszewska, A., Lazniewska, J., Trzepiński, P., **Marcinkowska, M.**, Klajnert-Maculewicz B. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules*. 2019, 1:9(8). E330. IF 4,694; 100 pkt. MNiSW (opublikowany po 31 lipca 2019 r.)
6. Sztandera, K., Działak, P., **Marcinkowska, M.**, Stańczyk, M., Gorzkiewicz, M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz, B. Sugar Modification Enhances Cytotoxic Activity of PAMAM-Doxorubicin Conjugate in Glucose-Deprived MCF-7 Cells - Possible Role of GLUT1 Transporter. *Pharmaceutical Research* 2019, 31:36(10), 140. IF 3,896; 40 pkt. MNiSW
7. Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B., **Marcinkowska, M.**, Duchnowicz, P., Appelhans, D., Grasso, G., Deriu, M.A, Danani, A., Cangioti, M. and Ottaviani, MF.

Multivalent interacting glycodendrimer to prevent amyloid-peptide fibril formation induced by Cu(II): a multidisciplinary approach. Nano Research. 2018, 1-23. IF 8,515; 45 pkt. MNiSW

8. Shcharbin, D., Pedziwiatr-Werbicka, E., Vcherashniaya, A., Janaszewska, A., **Marcinkowska, M.**, Goska, P., Klajnert-Maculewicz, B., Ionov, M., Abashkin, V., Ihnatsyey-Kachan, A., de la Mata, FJ., Ortega, P., Gomez-Ramirez, R., Majoral, JP., Bryszewska, M. Binding of poly(amidoamine), carbosilane, phosphorus and hybrid dendrimers to thrombin – Constants and mechanisms. Colloids and Surfaces B Biointerfaces. 2017, 155:11-16. IF 3,997; 35 pkt. MNiSW
9. Wrobel, D., **Marcinkowska, M.**, Janaszewska, A., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert-Maculewicz, B., Bryszewska, M., Štofík, M., Herma, R., Duchnowicz, P., Maly, J. Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins-Human serum albumin and lysozyme. Colloids and Surfaces B Biointerfaces. 2017, 152:18-28. IF 3,997; 35 pkt. MNiSW
10. Pędziwiatr-Werbicka, E, Miłowska, K., Podlas, M., **Marcinkowska, M.**, Brahmi, Y., Katir, N., Majoral, JP., Felczak, A., Lisowska, K., Bryszewska, M., El Kadib, A. Oleochemical-tethered-SBA-15-type mesoporous silicates with tunable nanoscopic order, carboxylic reactive-surface and hydrophobic framework: Impact on cellular toxicity, hemolysis and antibacterial activity. Chemistry - A European Journal. 2013;1-9. IF 5,696; 40 pkt. MNiSW
11. Wasiak, T., **Marcinkowska, M.**, Pieszynski, I., Zablocka, M., Caminade, AM., Majoral, JP., Klajnert- Maculewicz, B. Cationic phosphorus dendrimers and therapy for Alzheimer's disease. New Journal of Chemistry. 2015, 39, 4852-4859. IF 3,277; 30 pkt. MNiSW
12. Janaszewska, A., Gradzinska, K., **Marcinkowska, M.**, Klajnert-Maculewicz, B., Stanczyk, WA. In vitro studies of polyhedral oligo silsesquioxanes: Evidence for their low cytotoxicity. Materials. 2015, 8, 6062-6070. IF 2,651; 35 pkt. MNiSW

Zgłoszenia patentowe

1. Sposób otrzymywania koniugatu docetakselu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie docetakselu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi. (Klajnert-Maculewicz B., Janaszewska A., Marcinkowska M., Sobierajska E., Stańczyk, M. Stańczyk, W., data zgłoszenia 25.01.2017) **P.420273**
2. Sposób otrzymywania koniugatu docetakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie docetakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na

powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi. (Klajnert-Maculewicz B., Janaszewska A., Marcinkowska M., Sobierajska E., Stańczyk, M. Stańczyk, W., data zgłoszenia 24.01.2017) **P.420274**

Kierowanie projektem badawczym

2016–2019 projekt NCN PRELUDIUM „Koniugaty nanocząstek z przeciwciałem monoklonalnym - nowe otwarcie w celowanej terapii przeciwnowotworowej”, 2015/19/N/NZ3/02942 – kierownik mgr Monika Marcinkowska

Udział w projektach badawczych jako wykonawca:

2018–2021 projekt NCN OPUS „Dendrymery fosforowe jako nośniki fotouczulaczy - badania in vivo“, 2017/25/B/NZ7/01304 – kierownik prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

2019–2021 projekt NCN PRELUDIUM „Dendrymer PAMAM jako nośnik mesalazyny dla zwiększenia efektywności terapii nieswoistych zapaleń jelit - badania in vitro”, 2018/31/N/NZ7/00374 – kierownik mgr Michał Gorzkiewicz

2013–2016 Projekt NCN OPUS „Oligosilseskwioxanowe nano-nośniki leków“, 2012/07/B/ST5/02603 – kierownik prof. dr hab. Włodzimierz Stańczyk

Staż naukowe



3.04.2018 – 2.05.2018 program POLONIUM – LCC CNRS, Tuluza (Francja).

3.05.2018 – 3.07.2018 program Erasmus+ – LCC CNRS, Tuluza (Francja).

21.02.2019 – 17.03.2019 program COST Action CA17140 „Nano2Clinic. Cancer Nanomedicine – from the bench to the bedside”, STSM – LCC CNRS, Tuluza (Francja).

Wykaz komunikatów zjazdowych o zasięgu międzynarodowym

1. 8-11.04.2019 **M. Marcinkowska**, A. Janaszewska, B. Klajnert-Maculewicz, COST Action CA17140 Nano2Clinic (Triest, Włochy). "Dendrimer conjugates with a monoclonal antibody in targeted tumor therapy" Cytotoxicity of PAMAM-PYRROLIDONE dendrimers" – plakat
2. 8-10.02.2017 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska, B. Klajnert-Maculewicz. 24th Young Research Fellows' Meeting Of the French Medicinal Chemistry Society (Châtenay-Malabry, Francja). "Nanoparticle conjugates with the monoclonal antibody – a new way in targeted tumor therapy" – plakat
3. 26-29.06.2016 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**, A. Janaszewska, M. Stańczyk, B. Klajnert-Maculewicz. CLINAM European Foundation for Clinical Nanomedicine (Bazylea, Szwajcaria). "Conjugates of PAMAM dendrimer, taxanes and monoclonal antibody - a way to increase effectiveness in breast cancer therapy" – plakat
4. 24-25.03.2014 **M. Marcinkowska**, P. Piątek, A. Janaszewska, JF. Petersen, M. Ficker, JB. Christiansen, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, XXIst Young Research Fellow Meeting (Montpellier, Francja). "Cytotoxicity of PAMAM-PYRROLIDONE dendrimers" – prezentacja ustna
5. 20-22.03.2014 P. Piątek, **M. Marcinkowska**, A. Janaszewska, B. Voit, D. Appelhans, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, III XXIst Young Research Fellow Meeting (Montpellier, Francja). "Application of sugar modified dendrimers in neurodegenerative disorders" – plakat

Wykaz komunikatów zjazdowych o zasięgu ogólnopolskim

1. 7-9.05.2016 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska. V Konferencja Biologii Molekularnej (Łódź). „Dendrymery w chemioterapii” – plakat
2. 12-14.05.2016 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska. Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu – BioOpen (Łódź). „Dendrymery PAMAM jako nośniki taksanów” – plakat
3. 30.06-2.07.2016 **M. Marcinkowska**. Polish Scientific Networks (Wrocław). „Koniugaty dendrymerów PAMAM z trastuzumabem – zwiększenie skuteczności terapii przeciwnowotworowej” – plakat
4. 20-21.05.2016 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. II Studencka Konferencja Genetyczna Genomica (Kraków). „Innowacyjne podejście do walki z nowotworem czyli terapia „podwójnie” celowana z wykorzystaniem dendrymerów jako nośników kompleksu trastuzumabu z doksorubicyną” – plakat

5. 22-24.04.2016 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. V Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne „Symbioza” (Warszawa). „PAMAM dendrimers as carriers of a double weapon – the complex of paclitaxel and trastuzumab” – plakat
6. 20-22.05.2016 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska, B. Klajnert- Maculewicz. V International Conference of Biophysics Students (Kraków). „Influence of PAMAM-taxanes conjugates on the breast cancer cells” – plakat
7. 29-31.05.2016 E. Sobierajska, M. Marcinkowska. V International Conference of Biophysics Students (Kraków). “Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment” – prezentacja ustna
8. 26-28.03.2015 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. IV Konferencja Biologii Molekularnej (Łódź). „Dendrymery PAMAM jako nośniki Docetakselu” – plakat
9. 26-28.03.2015 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska. IV Konferencja Biologii Molekularnej (Łódź). „Dendrymery PAMAM w terapii raka piersi” – plakat
10. 18-19.04.2015 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. IV Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych (Wrocław). „Dendrymery PAMAM jako nośniki Paklitakselu” – plakat
11. 20-22.04.2015 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu – BioOpen (Łódź). „Koniugacja leku przeciwnowotworowego z dendrymerem PAMAM – sposób na zwiększenie skuteczności chemioterapii” – plakat
12. 22-24.05.2015 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. III Studenckiej Konferencji Biologii Medycznej „Biofuzje” (Warszawa). „Dendrymery PAMAM w terapii nowotworowej z zastosowaniem podwójnie uzbrojonej siły - kompleksu przeciwciała z lekami przeciwnowotworowymi” – plakat
13. 29-31.05.2015 E. Sobierajska, **M. Marcinkowska**. IV Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne „Symbioza” (Warszawa). „Dendrymery PAMAM w chemioterapii z zastosowaniem doksorubicyny (DOX) – plakat
14. 22-24.05.2015 **M. Marcinkowska**, E. Sobierajska, B. Klajnert-Maculewicz. III International Conference of Biophysics Students (Kraków). „Influence of PAMAM dendrimers and anticancer drugs conjugates on the breast cancer cells – plakat
15. 20-22.03.2014 **M. Marcinkowska**, P. Piątek, A. Janaszewska, JF. Petersen, M. Ficker, JB. Christiansen, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej (Łódź). „Biomedyczne zastosowania dendrymerów PAMAM modyfikowanych pyrrolidonem” – plakat
16. 16-18.05.2014 **M. Marcinkowska**, A. Janaszewska, B. Klajnert-Maculewicz, III Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne “Symbioza” (Warszawa).

“Dendrymer-lek jako nowoczesny sposób na zwiększanie skuteczności terapii raka piersi” – plakat

17. 20-22.03.2014 P. Piątek, **M. Marcinkowaka**, A. Janaszewska, B. Voit, D. Appelhans, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej (Łódź). „Zastosowanie modyfikowanych dendrymerów PPI w chorobach neurodegeneracyjnych” – prezentacja ustna

Rak piersi to nowotwór, który obok raka jajnika oraz macicy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet. Jedna trzecia z rozpoznanych przypadków raka piersi ma zbyt wiele kopii genu ERBB2 kodującego białko HER2, czego rezultatem jest nadekspresja receptora HER2. Anomalia ta prowadzi do szybszego wzrostu raka i agresywniejszego przebiegu choroby, a nowotwory obarczone nią wykazują większą lekooporność. Trastuzumab jest rekombinowanym humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, które selektywnie łącząc się z IV domeną zewnątrzkomórkowej części białka HER2, hamuje nadmierną proliferację komórek guza. Według licznych opracowań i badań klinicznych skuteczność chemioterapii prowadzonej z trastuzumabem jest większa w porównaniu do terapii prowadzonej wyłącznie z zastosowaniem leków z rodziny antracyklin czy taksanów. Niestety występująca oporność na trastuzumab oraz jego działanie uboczne (tj. kardi toksyczność) są często przyczyną przerwania leczenia.

Dobrze udokumentowane wyniki zastosowania dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych stanowią podstawę do użycia ich jako elementu łączącego przeciwciało monoklonalne trastuzumab i leki przeciwnowotworowe. Dendrymery poprawiają rozpuszczalność leków, a także zapewniają stopniowe ich uwalnianie oraz zapewniają ukierunkowany transport. Ponadto obecność dokoniugowanego trastuzumabu zapewnia skuteczny transport leku do komórek z nadekspresją HER2. W pracy zsyntezowano szeroką grupę koniugatów dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) z lekami z grupy antracyklin (doksorubicyna) i taksanów (docetaksel i paklitaksel) w poszukiwaniu najefektywniej działającego systemu przeciwnowotworowego, który dzięki przyłączonemu przeciwciału monoklonalnemu (trastuzumab) posiadałby zdolność selektywnego działania w terapii raka piersi z nadekspresją HER2.

Aby potwierdzić skuteczność i selektywne działanie koniugatów dokonano oceny cytotoksyczności koniugatów (testem MTT) i wyznaczono parametr IC_{50} dla dwóch linii komórek raka piersi SKBR-3 HER2-pozytywnej i MCF-7 HER2-negatywnej. Uzyskane wyniki potwierdziły selektywność koniugatów dendrymeru PAMAM z lekami i trastuzumabem względem komórek z nadekspresją receptora HER2. Zwłaszcza koniugat z docetaksem wykazywał wyjątkowo wysoką toksyczność wobec komórek SKBR-3 i niską toksyczność wobec komórek MCF-7. Stwierdzono, iż wyniki cytotoksyczności uzyskane testem MTT są rezultatem szybszego wnikania leków związanych z nośnikiem. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwiło potwierdzenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych związków. Aby wyłonić układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 dokonano porównania mechanizmów działania najbardziej selektywnych koniugatów dendrymeru PAMAM z taksanami i trastuzumabem. W tym celu oznaczono poziom reaktywnych form tlenu, zmiany potencjału mitochondrialnego, aktywację kaspaz, indukcję apoptozy i rozkład faz cyklu komórkowego. Przeprowadzone badania pokazały złożoność mechanizmu cytotoksycznego działania koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab. Wyróżnić można trzy główne sposoby ich działania: pierwszy mechanizm to stres oksydacyjny, który prowadzi do powstawania wolnych rodników, drugi to mitochondrialna aktywacja kaskady kaspaz i trzeci związany z blokowaniem receptora HER2.

Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę badawczą, iż koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi działają skuteczniej niż wolne leki, a dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewnia selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją receptora HER2.

Na podstawie badań wyłoniono układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 – koniugat PAMAM-docetaksel-trastuzumab.

Breast cancer, next to ovarian and uterine cancer, is one of the most common malignancies in women. One-third of diagnosed breast cancer cases have too many copies of the ERBB2 gene encoding the HER2 protein that results in overexpression of a HER2 receptor. Such anomaly leads to faster cancer growth with higher drug resistance and more aggressive disease progress. Trastuzumab is a recombinant, humanized monoclonal antibody that selectively binds to the IV domain of the HER2 protein and inhibits excessive proliferation of tumor cells. Numerous research and clinical studies show that the effectiveness of chemotherapy with trastuzumab is greater compared to the therapy with anthracyclines or taxanes. Unfortunately, emerging resistance to trastuzumab and side-effects such as cardiotoxicity are often the reason for discontinuation of the treatment.

The well-documented results of the dendrimers application as anti-cancer drugs carriers enable their use as a linking element between monoclonal antibody (trastuzumab) and anti-cancer drugs. Dendrimers improve the drugs solubility and also ensure their gradual release in the tumor environment. In addition, the presence of conjugated trastuzumab ensures effective drug transport to HER2-overexpressed cells. Therefore, PAMAM dendrimer conjugates with anthracyclines (doxorubicin) and taxanes (docetaxel and paclitaxel) were synthesized to select the most effective anti-cancer system that, thanks to the attached monoclonal antibody, would have the ability to act selectively in the treatment of the HER2 overexpressing breast cancer.

To confirm the effectiveness and selective cytotoxicity of the conjugates, their cytotoxicity was assessed (MTT test) and the IC_{50} parameter was determined for two breast cancer cell lines (SKBR-3 HER2-positive and MCF-7 HER2-negative). The obtained results confirmed the selectivity of PAMAM dendrimer conjugates with drugs and trastuzumab towards cells overexpressing the HER2 receptor. In particular, the docetaxel conjugate showed extremely high toxicity to SKBR-3 cells and low toxicity to MCF-7 cells. It was found that the observed cytotoxicity was the result of faster penetration of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates to cells. The confocal microscopy confirmed the intracellular location of the analyzed compounds. In order to identify the system with the greatest therapeutic potential in the treatment of the HER2-overexpressing breast cancer, the mechanisms of action of the most selective PAMAM dendrimer conjugates with taxanes and trastuzumab were compared. For this purpose, the level of reactive oxygen species, changes in mitochondrial potential, activation of caspases, induction of apoptosis and cell cycle phase distribution were determined. Obtained results have shown the complexity of the cytotoxic mechanism of PAMAM-drug-trastuzumab conjugate activity. There are three main modes of action: the first mechanism is oxidative stress, which leads to the formation of free radicals, the second one is the mitochondrial activation of the caspase cascade and the third one is associated with blocking the HER2 receptor.

The obtained results confirmed the research hypothesis that PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs are more effective than free drugs, and the conjugation with a monoclonal antibody ensures selectivity of conjugates towards tumor cells overexpressing the HER2 receptor.

Finally, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate was identified as the system with the greatest therapeutic potential in the treatment of the breast cancer with HER2 overexpression.

Article

Molecular Mechanisms of Antitumor Activity of PAMAM Dendrimer Conjugates with Anticancer Drugs and a Monoclonal Antibody

Monika Marcinkowska ¹, Maciej Stanczyk ², Anna Janaszewska ¹, Arkadiusz Gajek ³,
Malgorzata Ksiezak ¹, Paula Dzialak ¹ and Barbara Klajnert-Maculewicz ^{1,4,*} 

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

² Department of Surgical Oncology, Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital, 93-513 Lodz, Poland

³ Department of Medical Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

⁴ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany

* Correspondence: barbara.klajnert@biol.uni.lodz.pl

Received: 31 July 2019; Accepted: 27 August 2019; Published: 29 August 2019



Abstract: Taxanes are considered fundamental drugs in the treatment of breast cancer, but despite the similarities, docetaxel (doc) and paclitaxel (ptx) work differently. For this reason, it is interesting to identify mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates that carry docetaxel or paclitaxel and monoclonal antibody trastuzumab, specifically targeted to cells which overexpressed HER-2. For this purpose, the impact on the level of reactive oxygen species, the mitochondrial membrane potential, cell cycle distribution and the activity of caspases-3/7, -8 and -9 of PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates was determined and compared with free docetaxel and paclitaxel toward HER-2-positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines. Moreover, apoptosis and necrosis were studied using flow cytometry and confocal microscopy, respectively. Our studies show the complexity of the potential mechanism of cytotoxic action of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates that should be sought as a resultant of oxidative stress, mitochondrial activation of the caspase cascade and the HER-2 receptor blockade.

Keywords: trastuzumab; taxanes; tumour targeting; mitochondrial membrane potential; reactive oxygen species (ROS) formation

1. Introduction

The history of taxanes begin in the early 1960s with the discovery of the antitumor activity of *Taxus brevifolia* tree bark extract, named paclitaxel (Taxol, ptx) in 1971 [1]. Docetaxel—a semi-synthetic analogue of paclitaxel, which in some cases exhibits better efficacy than paclitaxel—was approved by the FDA for breast cancer treatment in 1996 [2]. In the nineties, paclitaxel and docetaxel were approved for the treatment of other solid tumours, and they are still fundamental in the treatment of advanced and early-stage breast cancer. Discovered in the eighties, the mechanism of action of taxanes demonstrated tubulin stabilisation causing mitotic arrest [3,4]. Taxanes bind to the β -microtubule chain and enhance tubulin polymerisation. Docetaxel and paclitaxel can inhibit mitosis and intracellular transport within cells, leading to apoptotic cell death. Taxanes can also block the BCL-2 gene family and induce p53 gene activation, the consequence of which is mitotic arrest and cell death [5].

As the data from the literature demonstrates, the mechanism of action of taxanes is not limited to microtubule stabilisation, mitotic arrest and apoptotic cell death, and new aspects of these drugs are constantly discovered. Recently, it was shown that taxanes can also affect the androgen receptor (AR)

and a significant correlation was found between clinical response to taxane chemotherapy and AR cytoplasmic sequestration in hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients [6].

Taxanes, as well as other chemotherapy drugs, have their limitations, including multidrug resistance (MDR). Since paclitaxel and docetaxel have a high affinity for the ATP-dependent drug efflux pump P-glycoprotein (Pgp) [7], it is considered that Pgp expression by cancer cells can be responsible for resistance to taxanes. Another limitation may be overexpression of class III β -tubulin [8].

These are not the only limitations of taxanes. Despite the clinical progress in the treatment of cancer with taxanes, paclitaxel and docetaxel, their effectiveness is limited by hydrophobicity. Solvent-based delivery vehicles for chemotherapy agents allowing hydrophobic drugs to be administered intravenously are associated with serious toxic side effects [9]. Moreover, both taxanes suffer from the lack of tumour specificity. That is why new solutions are being sought, such as cabazitaxel, which exhibits improved potency against MDR-expressing tumours, but its clinical application is intended for prostate cancer only [10], or abraxane—the albumin-bound paclitaxel nano-droplet formulation—which expanded the clinical application of paclitaxel but is highly, not selectively, cytotoxic [11].

Therefore, drug combination appears to be the most attractive area of pre-clinical research, e.g., abraxane was successfully used with trastuzumab and carboplatin in first-line therapy for advanced HER-2 positive breast cancer [12] and docetaxel with pertuzumab and trastuzumab in first-line treatment for HER2-positive metastatic breast cancer [13]. The question arises what advantages can be achieved using a monoclonal antibody with taxanes? Our previous studies demonstrated the utility of trastuzumab as a targeting agent. Moreover, PAMAM dendrimer conjugates, with trastuzumab and docetaxel or paclitaxel, improved the efficacy of targeted delivery of these anticancer drugs [14]. Therefore, what is so unique in trastuzumab that it has such an impact on increasing the efficiency and selectivity of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates?

Trastuzumab is a recombinant humanised monoclonal antibody targeted against the extracellular domain of the HER-2 protein [15]. The HER-2 gene is overexpressed in more than 20% of all primary invasive breast cancers (HER-2-positive breast cancer) [16]. Because HER-2 overexpression is associated with poor disease-free survival, HER-2 gene amplifications are considered to be an independent adverse prognostic factor [17]. Some studies have shown that trastuzumab may increase the efficacy of commonly used chemotherapy as a factor supporting the induction of apoptosis [18]. Furthermore, several possible modes of action of trastuzumab have been proposed in the literature, such as cytotoxicity, inhibition of DNA repair, cell-cycle arrest, suppression of angiogenesis and inhibition of HER-2 extracellular proteolysis [19,20], but the exact mechanism of anticancer activity of trastuzumab alone or in combined therapy with anticancer drugs has not been fully elucidated. Therefore, studies that enable understanding the mechanism of anticancer activity of taxanes and trastuzumab are so important.

Our previous studies showed that application of PAMAM dendrimer conjugation significantly increased cellular uptake of taxanes, enabling passive delivery of paclitaxel or docetaxel, which consequently increased their cytotoxicity [14]. They also showed that trastuzumab can be used in a PAMAM-drug-trastuzumab conjugate carrying paclitaxel (ptx) or docetaxel (doc) to specifically target SKBR-3 HER-2 positive cells. Moreover, PAMAM-drug-trastuzumab conjugates proved increased toxicity toward HER-2-positive human breast cancer cells compared with the free drug or the PAMAM-trastuzumab conjugate.

Since the cytotoxic activity of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates and free drugs was previously tested on HER-2-positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines, the same cell lines were used in the present study to investigate the influence of the conjugates and drugs on mitochondrial membrane potential, the intracellular reactive oxygen species generation, caspases activity, cell cycle and ability to induce apoptosis or necrosis.

The results presented in this article are the next step to a better understanding of the mechanism responsible for the enhanced therapeutic effect of taxanes and selectivity of their conjugates with

trastuzumab in comparison with the free drugs. The analysed drugs and their conjugates showed a different mechanism of action. The PAMAM-doc-trastuzumab conjugate generated more reactive oxygen species than the free docetaxel, while conversely, the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate had a lesser influence on the intracellular ROS level than free paclitaxel. In the case of mitochondrial membrane potential, the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate acted similar to free taxanes, triggering at first an increased, and then a decreased, mitochondrial membrane potential, in contrast to the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, which evoked immediate mitochondrial depolarisation. Interestingly, only in the case of SKBR-3 cells, both PAMAM-drug-trastuzumab conjugates maintained the mechanism of action of free drugs and activated the caspase cascade, which was reflected in higher apoptosis induction. The most important finding was that all components of the conjugates, only when acting together, can achieve a higher efficacy and selective toxicity.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Solvents for the synthesis and purification were purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). All cell culture reagents were purchased from Gibco® (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warsaw, Poland). Flasks and multiwell transparent and black plates for in vitro studies were obtained from Nunc (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warsaw, Poland). PAMAM G4-NH₂ dendrimer, docetaxel, paclitaxel, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), propidium iodide (PI) and ribonuclease A deoxyribonuclease-free were purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). Trypan blue was purchased from Molecular Probes ((Thermo Scientific™, Warsaw, Poland). Annexin V and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H2DCF-DA) were purchased from BD Biosciences (Warsaw, Poland). Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay and Caspase-Glo® 9 Assay systems were purchased from Promega Corporation (Mannheim, Germany). Trastuzumab (Herceptin) was obtained from Roche Poland (Poznan, Poland). Human breast adenocarcinoma's cell lines, including HER-2 positive (SKBR-3 ATCC no. HTB-30) and HER-2 negative (MCF-7 ATCC no. HTB-22) were purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z o. o., Lomianki, Poland).

2.2. Synthesis of Conjugates

The linking of the taxanes to the PAMAM dendrimer was done using a two steps covalent method (patent pending P.420273) while the synthesis of PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates was performed according to the methods (patent pending P.420274) described earlier [14]. The stoichiometric ratio of PAMAM-drug conjugate was 1:1 and PAMAM-drug-trastuzumab conjugate was 1:1:1, respectively.

2.3. Cell Culture

MCF-7 (HER-2 negative human breast adenocarcinoma cell line) was cultured in DMEM medium enriched with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) and GlutaMAX. SKBR-3 (HER-2 positive human breast adenocarcinoma cell line) was cultured in McCoy's 5A medium also supplemented with GlutaMAX and 10% (v/v) FBS. Cells were cultured in T-75 culture flasks in the atmosphere containing 5.0% CO₂ at 37 °C and subcultured every 2–3 days. Cells were used in experiments after obtaining 80–90% confluence. The number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay using a Invitrogen Countess Automated Cell Counter (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warsaw, Poland). Cells were seeded in flat bottom 96-well transparent plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 µL of an appropriate medium or in flat bottom 12-well transparent plates at a density of 2.0×10^5 cells/well in 1 mL of an appropriate medium. After seeding, plates were incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5.0% CO₂ at 37 °C.

2.4. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS)

Changes in the level of reactive oxygen species were checked using a fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein. The biological mechanism of the probe activity is the elimination of acetate groups by intracellular esterases, followed by oxidation of the compound to dichlorofluorescein (DCF) [21]. Cells were seeded on 96-well black plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 μ L of an appropriate medium. After treatment, cells were stained with 2 μ M H₂DCFDA for 15 min in growing conditions. Subsequently the dye solution was removed and cells were washed with PBS. Fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm) was measured using the Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

2.5. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

Mitochondrial membrane potential was measured using a JC-1 fluorescent lipophilic cationic dye, which at higher concentrations forms J-aggregates accumulating in mitochondria and exhibits red fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm). When the mitochondrial membrane is depolarized, the dye does not aggregate but exists in the form of monomers, which emit green fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm). The loss of $\Delta\Psi_m$ can be indicated by a decrease in the red to green fluorescence intensity ratio [22]. Cells were seeded on 96-well black plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 μ L of an appropriate medium. After treatment, 50 μ L of 5 μ M JC-1 was added to each well and incubated for 30 min in growing conditions. The dye was removed, cells were washed with PBS and then 50 μ L of PBS was added to each well. Measurements were performed using the Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader.

2.6. Measurement of Caspases Activity

Estimates of the activity of caspases-3/7, -8 and -9 were performed using assay kits (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay and Caspase-Glo® 9 Assay systems Promega Corporation) according to the producer recommendations.

Cells were seeded on 96-well black plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 μ L of an appropriate medium. After treatment cells were centrifuged and 50 μ L of supernatant was transferred to new 96-well black plate. Then 50 μ L of the reaction mixture was added to each well and incubated for 20/40/60 min in growing conditions. The chemiluminescence was read using the Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader.

2.7. Detection of Apoptotic and Necrotic Cells

Annexin V and propidium iodide (PI) staining was performed to detect apoptotic and necrotic cells. Annexin V is a protein that specifically binds to phosphatidylserine, which is translocated from the inner layer of the plasma membrane to the outer layer during early apoptotic cells. The cell membrane of apoptotic cells stained with Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) is not permeable to the red fluorescent dye propidium iodide, which is able to penetrate the interior of necrotic cells. For this reason, the method is suitable to distinguishing between intact, apoptotic and necrotic cell populations. A low level of green fluorescence is characteristic for viable cells. Apoptotic cells show an increased level of green fluorescence, while necrotic cells exhibit both red and green fluorescence [23]. Cells were seeded in 24-well transparent plates. After treatment, cells were trypsinised, and then washed with PBS and suspended in 500 μ L of binding buffer (delivered from the producer). The mixture consisting of 5 μ L of Annexin V conjugated with FITC and 5 μ L of propidium iodide was added to cell suspension. Samples were incubated at room temperature for 20 min in the dark. Measurement of fluorescence intensity was performed by a Becton Dickinson LSR II flow cytometer. The control apoptosis was induced by camptothecin (80 μ M) and necrosis was induced by pentachlorophenol (0.6 μ M) (data not shown). The data were recorded for a total of 10,000 events per sample.

2.8. Confocal Microscopy

Confocal microscopy images were obtained using confocal inverted microscope SP-8, Leica equipped with 405 nm laser (Labsoft Sp. z o.o., Warsaw, Poland). Cells at the density of 1×10^4 cells/well (SKBR-3) and 0.75×10^4 cells/well (MCF-7) were seeded on 96-well glass-bottom plates and incubated with 1 μ M docetaxel or paclitaxel or PAMAM-doc-trastuzumab or PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate for 24 h in 37 °C humidified atmosphere containing 5.0% CO₂. After treatment, cells were washed with PBS, and then suspended in 100 μ L of binding buffer (delivered from the producer). The mixture consisting of 1 μ L of Annexin V fluorescein isothiocyanate and 1 μ L of propidium iodide was added to cell suspension. Samples were incubated at room temperature for 20 min in the dark. Thereafter, cells were cooled on ice and washed once with cold phosphate buffered saline. Cells were imaged to visualize fluorescence of FITC labelled Annexin V in the green channel (excitation 488 nm, emission 520 nm) and propidium iodide in the red channel (excitation 535 nm, emission 617 nm).

2.9. Cell Cycle Studies

Cell cycle distribution was analysed by flow cytometry (LSRII; Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) after propidium iodide staining according to Chang et al. [24]. Cells were seeded in 24-well plates. After treatment cells were trypsinised, collected and fixed in ice-cold 96% ethanol for 24 h. Then, cells were washed with PBS and incubated for 30 min at 4 °C in 500 μ L of staining solution containing 10 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 5 mM magnesium chloride, 10 μ g/mL propidium iodide and 10 μ g/mL ribonuclease A. After this time samples were analysed by a Becton Dickinson LSRII flow cytometer. The data were recorded for a total of 10,000 events per sample.

2.10. Statistical Analysis

Data was expressed as mean $\pm$ SD. Analysis of variance (ANOVA) with the Tukey post hoc test was used for results comparison. All statistics were calculated using the Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK, USA), and $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

Our previous studies showed that PAMAM-drug-trastuzumab conjugates possess increased toxicity toward HER-2-positive human breast cancer cells compared with the free drug or the PAMAM-trastuzumab conjugate. The IC₅₀ values in SKBR-3 cells were equal to 0.004 μ M for the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate and 0.002 μ M for the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate after a 48 h incubation compared with the 2 μ M concentration of free docetaxel and 0.49 μ M of free paclitaxel, respectively. However, the most remarkable observation was the selectivity between cell lines, especially for the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate (48.85 μ M for MCF-7 HER-2-negative and 0.004 μ M for SKBR-3 HER-2-positive cell lines) [14]. The IC₅₀ value for SKBR-3 cells confirmed also the increase in selectivity and therapeutic effect compared not only to free drugs but also to the PAMAM-trastuzumab conjugate (0.41 ± 0.06 μ mol/L) [25]. It is important to mention that toxicity of the cationic amino-terminated PAMAM dendrimer generation 4 had no impact on the overall PAMAM-drug-trastuzumab conjugates cytotoxicity in the 0.002–0.004 μ M concentration range, since our previous studies proved that for this dendrimer the IC₅₀ values obtained for sensitive Chinese hamster ovary (CHO) and resistant human ovarian carcinoma (SKOV3) cell lines were 5.56 and 46.49 μ M, respectively [26]. High toxicity is usually correlated with a higher production of ROS, and finally, induction of cell death. The interaction of most anticancer drugs with the mitochondria led to ROS production. Moreover, the intracellular ROS play an important role in apoptosis through affecting several signalling pathways [27,28]. Since oxidative stress has an influence on mitochondria, the cellular redox homeostasis is a crucial factor in the modulation of apoptosis [26]. For this reason, it is very important to check whether the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates can initiate oxidative resulting from cell overproduction of ROS.

To fully understand the mechanisms of HER-2-negative and HER-2-positive cell death, ROS production was estimated by the formation of a highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF), the compound formed after the oxidation of non-fluorescent H2DCF-DA by cytosolic esterases [21]. As shown in Figure 1, after a 3 h incubation, only free drugs enhanced the production of ROS, especially the highest 20 μ M paclitaxel concentration in the SKBR-3 cell line. After a 24 h incubation, some of the cells treated with free drugs were already dead, while PAMAM-drug-trastuzumab conjugates were just starting to act. Our measurements of ROS formation brought interesting findings. Considering the SKBR-3 cell line (Figure 1, right panel), paclitaxel induced a higher level of ROS than the more toxic PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate. Some reports have indicated that taxanes only provoke a low level of oxidative stress and they generate some ROS, but the apoptosis they trigger in cancer cells is mainly by the release of cytochrome c from mitochondria [29]. However, one must bear in mind that paclitaxel is not soluble in water, but in DMSO, and therefore, the observed effect might be enhanced by the solvent. In the case of the conjugates, PAMAM dendrimers may affect the ROS production because, on the one hand, they are the substitute for the solvent, but on the other hand, they have an impact on mitochondria. Mukherjee et al. showed that the interaction of amino-terminated PAMAM dendrimers with the mitochondria led to ROS production [30]. Mohan et al. demonstrated that trastuzumab significantly enhanced the generation of intracellular ROS, peroxides and free radicals in cardiomyocytes [31]. Thus, one would expect that the observed effect of the conjugate should be the resultant of the action of these three components: The anticancer drug, the PAMAM dendrimer carrier and the monoclonal antibody trastuzumab. However, the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate induced only a low level of ROS in comparison to free paclitaxel. Interestingly, the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate generated more ROS than the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, but after a 24 h incubation. This may be the first step in indicating a difference in the mechanism of action of these conjugates.

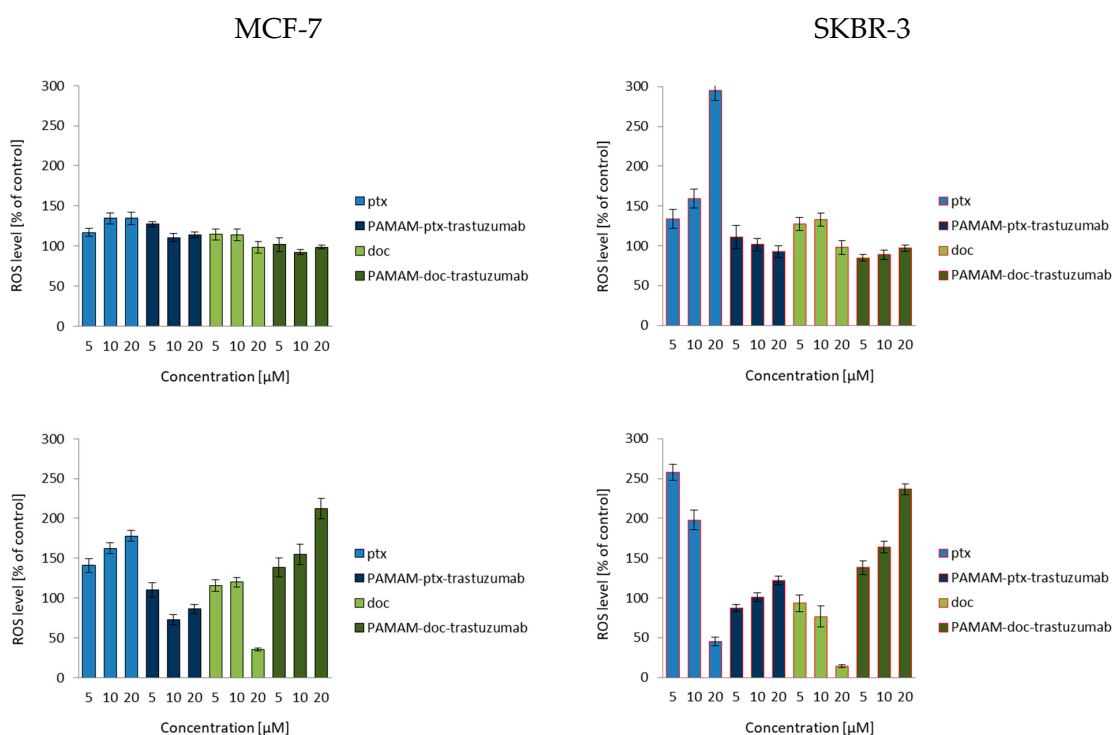


Figure 1. Influence of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, paclitaxel (ptx) and docetaxel (doc) at a concentration range of 5–20 μ M on the ROS generation in MCF-7 cells (left panel) and SKBR-3 cells (right panel) after 3 and 24 h incubation periods. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments.

Mitochondria activation most often leads to changes in the mitochondrial membrane potential, permeability transition, increased production of intracellular ROS and the generation of apoptotic proteins in the cell. The change of mitochondrial membrane potential can cause cell death. Zorov et al. described mechanisms assuming that an increase in ROS generation reaching a threshold level which caused the opening of the channels in mitochondrial membrane, resulted in the collapse of its potential and increased ROS production [32]. Mitochondrial depolarisation—a decrease in the mitochondrial membrane potential—occurs in the early stages of apoptosis and is preceded by mitochondrial hyperpolarisation, relying on the locking of the voltage dependent anion channel (VDAC) with the Bax peptide [33] or by generating a proton gradient across the inner membrane [34].

According to current knowledge on the action of taxanes, after a 3 h incubation, both docetaxel and paclitaxel increased the mitochondrial membrane potential only to decrease it after a 24 h incubation (Figure 2). Many *in vitro* studies have showed that paclitaxel and docetaxel are able to alter the mitochondrial structure, and their function can evoke mitochondrial depolarisation due to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and release of Ca^{2+} from mitochondria [35–37]. An amino-terminated PAMAM G4 dendrimer can also decrease the mitochondrial membrane potential in a concentration-dependent manner, where the higher the toxicity of the dendrimer the higher the depolarisation of the mitochondrial membrane [38]. Since trastuzumab can trigger cellular oxidative stress and induce apoptosis through the depolarisation of mitochondria, the action of all mentioned compounds together should also lead to mitochondrial defects, causing the opening of the mPTP and the activation of cell death pathways. Figure 2 summarises the results of the experiment devoted to the analysis of the ability of free paclitaxel and docetaxel, as well as PAMAM-drug-trastuzumab conjugates, to induce changes in mitochondrial membrane potential. As it can be observed in the case of the MCF-7 HER-2-negative cell line, there were significant differences between the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates. The PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate acted similar to free drugs, initially triggering an increase, followed by a decrease of the mitochondrial membrane potential, in contrast to the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, which evoked an immediate mitochondrial depolarisation. Interestingly, in the case of the SKBR-3 HER-2-positive cell line, both conjugates evoked very high mitochondrial depolarisation, especially after a 24 h incubation.

Analysing changes in mitochondrial potential, we noticed differences in the effects of free drugs and conjugates depending on the time of drug-treatment and the cell line. However, very large changes caused by conjugates compared to free drugs in the SKBR-3 HER-2-positive cell line confirmed our previous results of selective cytotoxicity and may suggest an even greater effect of the tested compounds on the activation of caspases and apoptosis.

One of the factors released from the mitochondria during depolarisation was cytochrome c (Apaf-2). In the cytoplasm, Apaf-2 combines with the protein factor Apaf-1 and procaspase-9 to form a structure called apoptosome. The main task of the apoptosome is to activate executive caspases [39]. Activation of procaspase-9 on the apoptosome is a crucial step in the intrinsic cell death pathway. Executive caspases are also essential for apoptosis-associated chromatin condensation, DNA fragmentation and nuclear collapse [40]. Second, a major cellular pathway of drug-induced apoptosis is the CD95 death receptor pathway, initiated by ligation of the death receptor by its ligand CD95L [41].

The release of cytochrome c and ligation of proapoptotic signals of CD95 activate initiator caspases, caspases-8 and -9, respectively. Then the initiator caspases activate the effector caspases, caspases-3, -6 and -7, which lead to the induction of apoptosis.

Since caspase activation occurs almost immediately after ROS generation (oxidative damage → caspases-8) or changes in mitochondrial membrane potential (mitochondria damage → caspases-9), the activity of caspase-8, -9 and -3/7 was studied at the same time points (3 and 24 h) for a 1 μM dose of free paclitaxel and docetaxel, as well as the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates. For all analysed compounds, a biphasic caspase activity was observed (Figure 3), similar to that caused by polyamidoamine dendrimer nanoparticles [38]. For free paclitaxel and docetaxel, an initial increase of caspases levels was observed after a 3 h incubation, while a decrease was observed after a 24 h

incubation, except for caspase-3/7, which reached a maximum level in the SKBR-3 line after a 24 h incubation period with the drugs. A similar behaviour was observed for the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates. In the MCF-7 cell line, both conjugates resulted in a decrease in the activity of all caspases, after reaching the initial maximum. In contrast, in the SKBR-3 cell line, the activity of all caspases increased to reach a maximum after a 24 h incubation period, especially caspase-3/7.

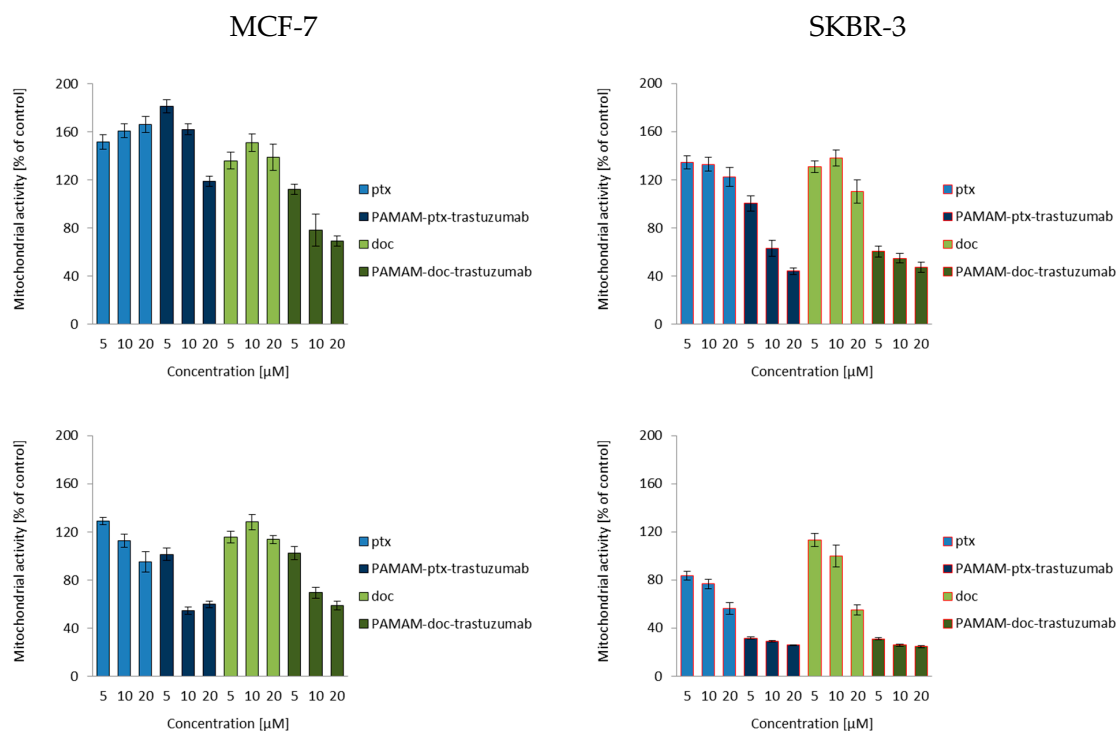


Figure 2. Influence of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, paclitaxel (ptx) and docetaxel (doc) on the mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells (**left panel**) and SKBR-3 cells (**right panel**) after 3 and 24 h incubation. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments.

This is a very important result, because it was shown in the case of SKBR-3 cells that both PAMAM-drug-conjugates maintain the mechanism of action of free drugs and activate initiator caspases-8 and -9, which participate in the activation of the caspase cascade—and of particular importance, caspase-3—which is necessary for cleavage of the majority of substrates examined, as well as DNA fragmentation and nuclear collapse resulting in apoptotic cell death [42]. Our results are in line with other studies showing the involvement of caspase activation in taxane-induced apoptosis of cancer cells derived from the breast cancer paclitaxel-sensitive MDA-MB-435 and paclitaxel-resistant NCI/ADR-RES cell lines [43]; the human pulmonary adenocarcinoma A549 cell line [44]; the ovarian cancer paclitaxel-resistant HER-2/neu-overexpressing SKOV3.ipl cell line [45]; and the prostate cancer DU145 cell line [46]. However, here arises the question: Why do the free drugs and conjugates, which in the MCF-7 cell line caused high mitochondrial membrane hyperpolarisation, not activate the caspase cascade in this cell line as strongly as they did in the SKBR-3 cell line? The precise reason for this inconsistency is not known, but we presume that the inconsistency might be due to cellular differences in tissue origin, status of differentiation or cell cycle checkpoint/regulatory proteins such as p53 [47]. Our hypothesis can be confirmed by other studies showing that, especially paclitaxel-induced apoptosis, is not always related to caspase activity, just like in the case of the lung cancer cell line NCI-H460, ovarian cancer cell line SKOV3 or the previously mentioned breast cancer MCF-7 cell line [48,49].

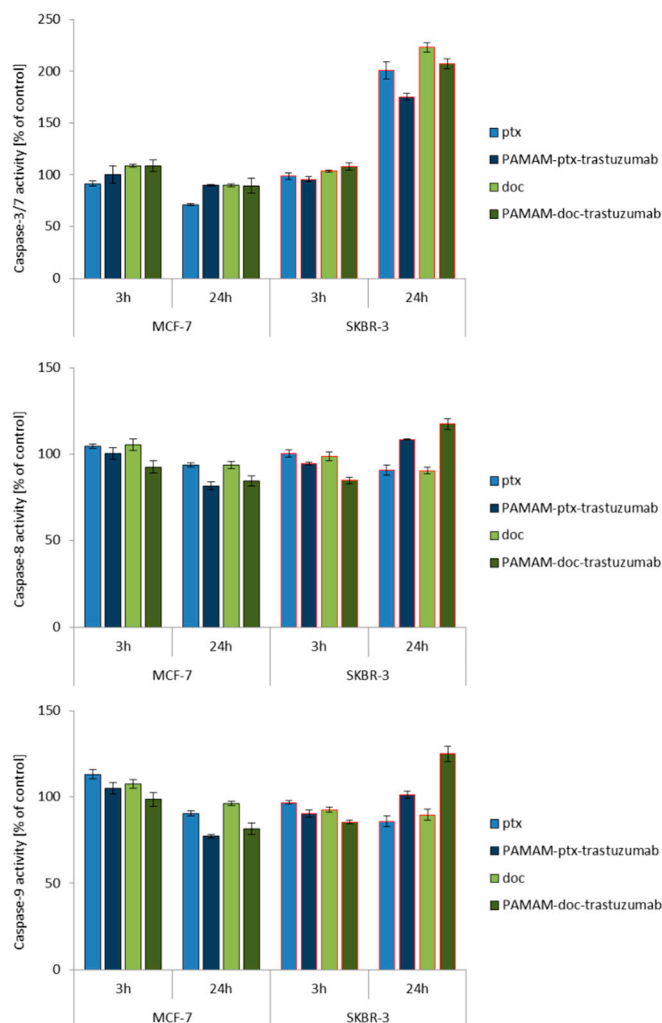


Figure 3. Influence of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, paclitaxel (ptx) and docetaxel (doc) on the caspases 3/7, 8 and 9 activation in MCF-7 and SKBR-3 cells after a 3 and 24 h incubation period. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments.

Since the results from this study indicate that PAMAM-drug-trastuzumab-induced apoptosis in SKBR-3 HER-2-positive cell line is associated with the caspase-dependent pathway, we decided to check fractions of apoptotic and necrotic cells after 3 and 24 h incubation periods with the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate and the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, as well as paclitaxel and docetaxel in both cell lines (Figure 4). Apoptosis is a form of programmed cell death that is characterised by condensation of the nuclear chromatin, cell shrinkage, DNA fragmentation, exposure of apoptotic bodies and changes in the symmetry of phosphatidylserine (PS). In contrast to apoptosis, necrosis is demonstrated by a loss of membrane integrity, shut down of metabolism and the release of cytoplasmic components [26]. The cell membrane of apoptotic cells stained with Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) is impermeable compared to the red fluorescent dye propidium iodide (PI), which can penetrate the interior of necrotic cells. As it can be observed in Figure 4, in the case of MCF-7 HER-2-negative cell line and the SKBR-3 HER-2-positive cell line, after 3 h, the conjugates were more effective than free drugs, resulting in a higher percent of early and late apoptotic cells (12.1% of cells for PAMAM-ptx-trastuzumab and 7.3% of cells for PAMAM-doc-trastuzumab in the MCF-7 cell line; 12.3% of cells for PAMAM-ptx-trastuzumab and 35.9% of cells for PAMAM-doc-trastuzumab in SKBR cell line, respectively), as compared to free drugs (10.9% of cells for paclitaxel and 12.0% of

cells for docetaxel in MCF-7 cell line; 5.5% cells for paclitaxel and 3.7% cells for docetaxel in SKBR cell line, respectively).

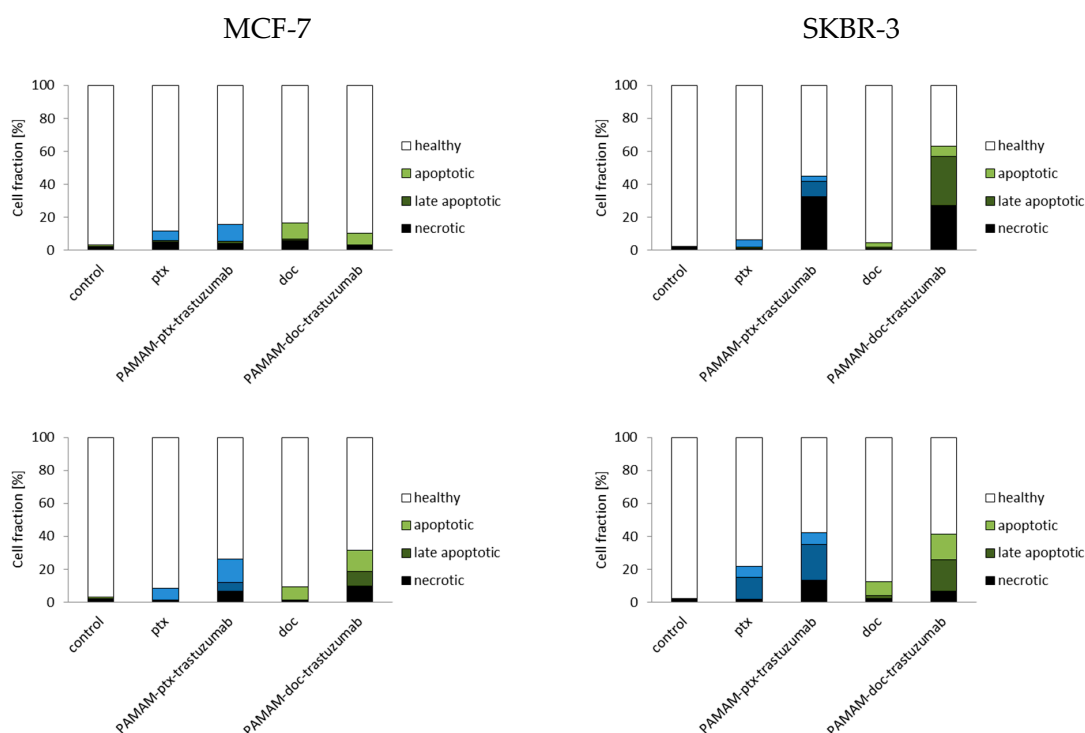


Figure 4. Fractions of apoptotic and necrotic cells after 3 and 24 h incubation periods with the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, paclitaxel (ptx) and docetaxel (doc) at a 1 μ M concentration in MCF-7 cells (**left panel**) and SKBR-3 cells (**right panel**). The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments.

Analysing the results after 24 h of incubation, it should be considered that some of the dead cells were too distorted to be measured by the flow cytometry. Therefore, the only information that is important is the fact that the fraction of early and late apoptotic cells after 24 h increased for both conjugates, especially for the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate in the SKBR cell line (15.3% of cells for the PAMAM-ptx-trastuzumab and 15.8% of cells for the PAMAM-doc-trastuzumab in the MCF-7 cell line; 28.5% of cells for the PAMAM-ptx-trastuzumab and 36.4% of cells for the PAMAM-doc-trastuzumab in the SKBR cell line, respectively). The results indicate that in the case of the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, the major mechanism of cell death is apoptosis. Kulhari et al.'s research also confirms that dendrimer conjugated with trastuzumab and docetaxel (TZ-Dend-DTX) is able to induce higher level of apoptosis than free docetaxel (DTX) [50]. In the case of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, the leading mechanism is initially necrosis, and after prolonged incubation, apoptosis. This is in line with our previous observations that in the case of a paclitaxel conjugate, other mechanisms may also be involved in the cell death process. Annexin V studies confirm that trastuzumab targeting is crucial for the enhanced cytotoxic activity of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates [14].

The results obtained from the analysis of fractions of apoptotic and necrotic cells were confirmed with confocal images (Figure 5). Applying confocal microscopy, it was shown that after a 24 h incubation period, both PAMAM-drug-trastuzumab conjugates caused numerous changes typical for apoptosis, but also for necrosis: Alteration in the structure, size and shape of the cell's nucleus, profound chromatin condensation, cell shrinkage and nuclear fragmentation, formation of apoptotic bodies, impairment of the plasma membrane and cell disintegration.

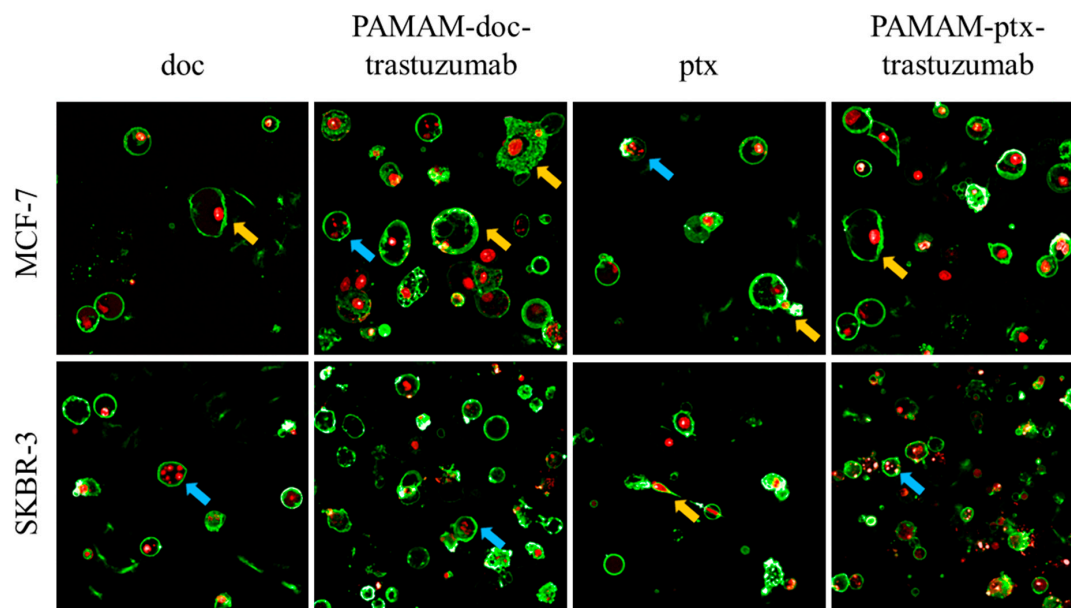


Figure 5. Representative confocal images of MCF-7 and SKBR-3 cells after a 24 h incubation period with the analysed compounds. The cells were stained with Annexin V and propidium iodide (PI). After drug treatment, a strong green fluorescence (derived from Annexin-V FITC) in the cells with phosphatidylserine translocated from the inner layer of the plasma membrane to the outer layer was noticed, which is characteristic for symptoms of programmed cell death. Cancer cells treated with investigated drugs present abnormal morphology: Chromatin condensation and fragmentation (marked by the blue arrows ) , giant cells and elongated cells with protrusions from the plasma membrane and cytoplasmic bridges between cells (marked by the yellow arrows ). For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

In addition to the generation of oxidative stress and the induction of apoptosis, another aspect of the action of anticancer drugs is the impact on the cell cycle. The cell cycle consists of several phases: G1–preparation for DNA synthesis; S–phase of DNA synthesis; G2–preparation for mitosis; and M–mitosis during which the cell divides into two similar cells. In these phases, there are also the checkpoints that ensure the integrity of the genome. The G1 and G2 checkpoints arrest the cell cycle when DNA damage is detected; in the S phase checkpoint, the cycle arrest is the result of a problem with DNA replication; and the M phase checkpoint is responsible for cell arrest if a problem with the mitotic spindle assembly occurs [51]. Taxanes interfere with the mitotic process and therefore they act mostly during the M phase, while trastuzumab influence the cell cycle causing cell arrest in the G1/S checkpoint [51,52]. Figure 6 summarises the results of the cell cycle analysis for control (untreated) cells and cells treated with free paclitaxel and docetaxel, as well as PAMAM-drug-trastuzumab conjugates at a 1 μ M concentration after a 3 and 24 h incubation period. In the case of the MCF-7 HER-2-negative cell line, after a 3 h incubation period, docetaxel only caused a slight cycle arrest in the G2/M phase, while the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate blocked as much as 56.6% of cells in the S phase. Interestingly, paclitaxel and its conjugate had no influence on the cell cycle. However, after a 24 h incubation, docetaxel and paclitaxel caused cell cycle arrest in the G2/M phase (87.4% and 86.7%, respectively), and both conjugates increased cell accumulation in the S phase (PAMAM-doc-trastuzumab to 86.8% and PAMAM-ptx-trastuzumab to 33.5%). In the case of the SKBR-3 HER-2-positive cell line after a 3 h incubation period, both free taxanes and the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate did not affect the cell cycle, only the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate induced significant cell accumulation in the G1 phase. After a 24 h incubation, paclitaxel and docetaxel increased cell accumulation in the S phase (slight) and in G2/M phase (significant), while the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate caused cell cycle arrest in the G1 and S phases (57.6% and 42.3%, respectively) and the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate only caused cell cycle arrest in the G1 phase

(72.5%). The results obtained for PAMAM-drug-trastuzumab conjugates are in good agreement with other data where trastuzumab has been found to interfere with HER-2 receptor signalling resulting in cell arrest at the G1/S checkpoint [53,54]. What is important in our study is that we showed that despite the reduction in the HER-2 receptors postulated in SKBR-3 cells, to the level that requires further trastuzumab efficacy [55], our conjugates enabled the trastuzumab to remain effective, and thanks to the combined action with taxanes, our PAMAM-drug-trastuzumab conjugates showed dose-dependent cytotoxicity and differences in molecular mechanisms of their antitumor activity.

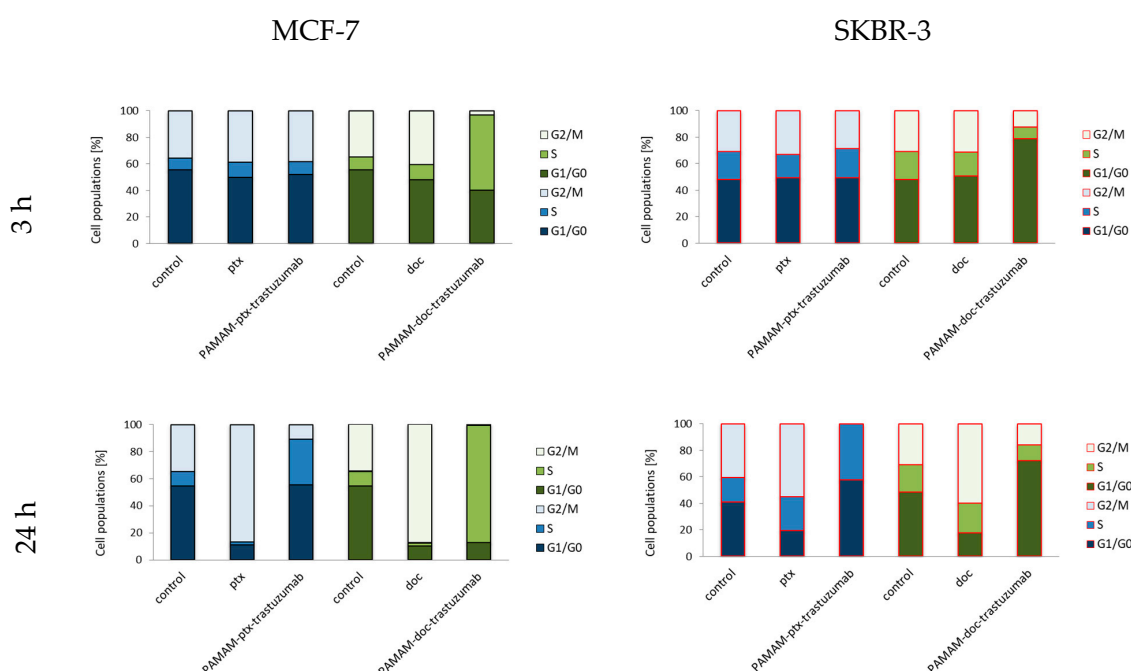
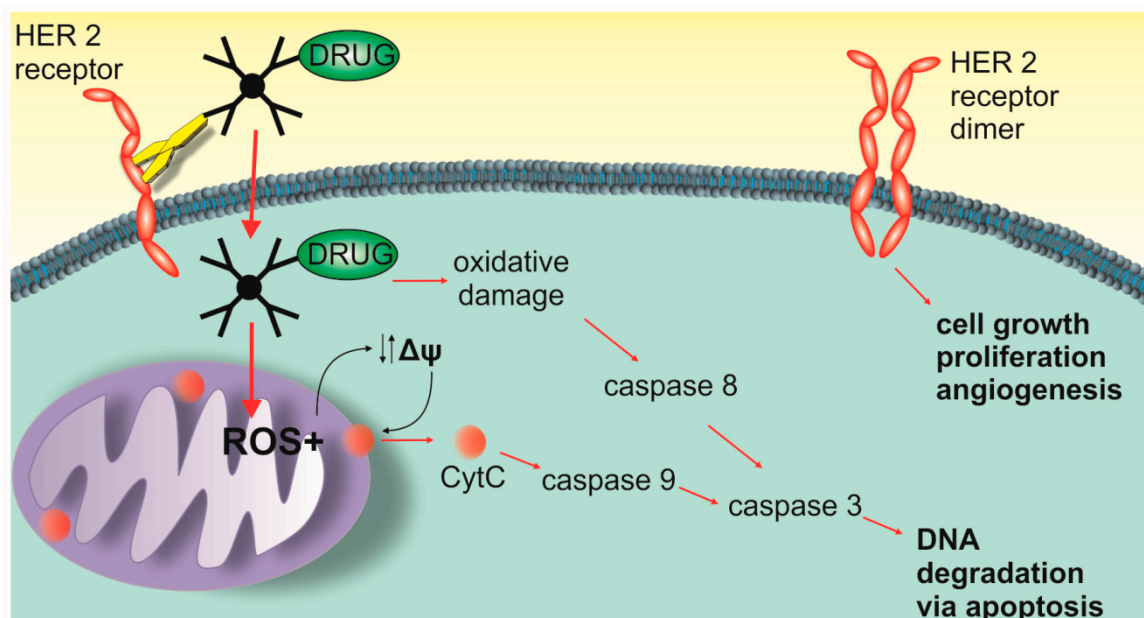


Figure 6. Cell cycle analysis for control (untreated cells) and cells treated with 1 μ M of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate, paclitaxel (ptx) and docetaxel (doc) in MCF-7 cells (**left panel**) and SKBR-3 cells (**right panel**) after 3 and 24 h incubation periods. The results are presented as the mean of three experiments.

The result, which was surprising to us was the accumulation of MCF-7 cells in the S phase caused by the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate and in the G1 and S phases caused by the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate, particularly after a 24 h incubation period. Even if docetaxel can also affect centrosome organisation in the S phase, resulting in incomplete mitosis, then paclitaxel should directly affect the mitotic spindle causing cell arrest in the G2/M phase [56]. A different pharmacological mechanism of taxanes regulation also does not explain the stronger activity of the conjugates compared to free drugs. Therefore, in our opinion, the explanation of this mechanism should be sought in the combined action of taxanes with other components of the conjugates. According to Collins et al.'s research, trastuzumab can induce a significant antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity response not only in the HER-2-positive HCC1954 and SKBR-3 cell lines, but also in five different HER-2-negative CAL-51, CAMA-1, MCF-7, T47D and EFM19 cell lines, all with the non-amplified HER-2 receptor, detectable only by western blot. Their results showed that despite the low level of HER-2 receptors in normal breast tissue, trastuzumab can bind to HER-2 non-amplified cells and induce a tumour-specific trastuzumab cytotoxicity response [57]. Moreover, some in vitro studies and even clinical trials reported that trastuzumab achieved synergistic interactions with paclitaxel or docetaxel in the MCF-7 HER-2-negative cell line, while only additive interactions in the SKBR-3 HER-2-positive cell line [58,59].

Our studies show the complexity of the potential mechanism of cytotoxic action of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates. Therefore, we propose three main modes of action for

them (Scheme 1). The first mechanism is oxidative stress that can lead to the generation of free radicals, the second is the mitochondrial activation of the caspases cascade and the third mechanism is associated with the blocking of the HER-2 receptor. The combination of these three modes of action may explain the complex mechanism of the selective action of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates.



Scheme 1. Three main modes of action of the PAMAM-ptx-trastuzumab and PAMAM-doc-trastuzumab conjugate.

4. Conclusions

Taxanes are considered fundamental drugs for breast cancer treatment, but despite their similarities, docetaxel and paclitaxel work differently. Both drugs bind to tubulin, but docetaxel binds stronger than paclitaxel; both drugs promote stabilisation of microtubules but in a different pattern; and both cause G2/M cell cycle arrest leading to cell death, but docetaxel has a more potent antitumor activity. The analysed PAMAM-drug-trastuzumab conjugates showed a different mechanism of action, but the most important finding is that all components of the conjugates, only when acting together, were able to achieve a higher efficacy and selective toxicity. However, bearing in mind that a different response to the drug may occur in cancer patients treated in the same way, and that pharmacodynamics of drugs depend on the complex interactions between genetic and epigenetic factors, our research should be continued in vivo.

Author Contributions: The manuscript was written through contributions of all authors; all authors have given approval to the final version of the manuscript; M.M. and A.J. conceived and designed the experiments; M.M., A.G., M.K. and P.D. performed the experiments; M.S. analysed the data; and A.J. and B.K.-M. wrote the paper.

Funding: This work was sponsored by the National Science Centre (Project PRELUDIUM: “Nanoparticle conjugates with the monoclonal antibody—a new opening in target tumor therapy” UMO-2015/19/N/NZ3/02942).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bissery, M.C.; Nohynek, G.; Sanderink, G.J.; Lavelle, F. Docetaxel (Taxotere): A review of preclinical and clinical experience. Part I: Preclinical experience. *Anti-Cancer Drugs* **1995**, *6*, 339–355, 363–368. [[PubMed](#)]

3. Schiff, P.B.; Horwitz, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1561–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rowinsky, E.K.; Cazenave, L.A.; Donehower, R.C. Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1247–1259. [[PubMed](#)]
5. Dumontet, C.; Sikic, B.I. Mechanisms of Action of and Resistance to Antitubulin Agents: Microtubule Dynamics, Drug Transport, and Cell Death. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. De Leeuw, R.B.-B.L.; Schiewer, M.J.; Ciment, S.J.; Den, R.B.; Dicker, A.P.; Kelly, W.K.; Trabulsi, E.J.; Lallas, C.D.; Gomella, L.G.; Knudsen, K.E. Novel actions of next-generation taxanes benefit advanced stages of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 795–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Jordan, M.A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265. [[CrossRef](#)]
8. Mozzetti, S.; Ferlini, C.; Concolino, P.; Filippetti, F.; Raspaglio, G.; Prislei, S.; Gallo, D.; Martinelli, E.; Ranelletti, F.O.; Ferrandina, G.; et al. Class III β -tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 298–305.
9. Ten Tije, A.J.; Verweij, J.; Loos, W.J.; Sparreboom, A. Pharmacological effects of formulation vehicles: Implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 665–685. [[CrossRef](#)]
10. Gupta, S. Novel Antitumoral Use of Cabazitaxel in Metastatic Prostate Cancer. U.S. Patent WO2011051894A1, 5 May 2011.
11. Desai, N.; Trieu, V.; Yao, Z.; Louie, S.; Ci, A.; Yang, C.; Tao, T.; De, B.; Beals, D.; Dykes, P.; et al. Soon-Shiong 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.* **2006**, *12*, 1317–1324.
12. Desai, N.P.; Soon-Shiong, P. Nanoparticles of Paclitaxel and Albumin in Combination with Bevacizumab against Cancer. U.S. Patent US20100112077A1, 6 May 2010.
13. Swain, S.M.; Kim, S.B.; Cortés, J.; Ro, J.; Semiglazov, V.; Campone, M.; Ciruelos, E.; Ferrero, J.M.; Schneeweiss, A.; Knott, A.; et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): Overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 461–471. [[CrossRef](#)]
14. Marcinkowska, M.; Stanczyk, M.; Janaszewska, A.; Sobierajska, E.; Chworos, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy. *Pharm. Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
15. Schaefer, N.G.; Pestalozzi, B.C.; Knuth, A.; Renner, C. Potential use of humanized antibodies in the treatment of breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1065–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hynes, N.E.; Stern, D.F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1198*, 165–184. [[PubMed](#)]
17. Ross, J.S.; Fletcher, J.A. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Stem Cells* **1998**, *3*, 413–428. [[CrossRef](#)]
18. Pegram, M.D.; Konecny, G.E.; O’Callaghan, C.; Beryt, M.; Pietras, R.; Slamon, D.J. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 739–749. [[CrossRef](#)]
19. Nahta, R.; Esteva, F.J. Herceptin: Mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 123–138. [[CrossRef](#)]
20. Kono, K.; Takahashi, A.; Ichihara, F.; Sugai, H.; Fujii, H.; Matsumoto, Y. Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5813–5817.
21. Bartosz, G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *368*, 53–76. [[CrossRef](#)]
22. Salvioli, S.; Ardizzoni, A.; Franceschi, C.; Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* **1997**, *411*, 77–82. [[CrossRef](#)]
23. Rieger, A.M.; Nelson, K.L.; Konowalchuk, J.D.; Barreda, D.R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J. Vis. Exp.* **2011**, *24*, e2597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Chang, K.-L.; Kung, M.-L.; Chow, N.-H.; Su, S.-J. Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: Involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 717–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Marcinkowska, M.; Sobierajska, E.; Stanczyk, M.; Janaszewska, A.; Chworos, A.; Klajnert-Maculewicz, B. Conjugate of PAMAM Dendrimer, Doxorubicin and Monoclonal Antibody—Trastuzumab: The New Approach of a Well-Known Strategy. *Polymers* **2018**, *10*, 187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Janaszewska, A.; Mączyńska, K.; Matuszko, G.; Appelhans, D.; Voit, B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. Cytotoxicity of PAMAM, PPI and maltose modified PPI dendrimers in Chinese hamster ovary (CHO) and human ovarian carcinoma (SKOV3) cells. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 428–437. [[CrossRef](#)]
27. Pathania, D.; Millard, M.; Neamati, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1250–1275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Spierings, D.; Berkovitch, F.; Nicolet, Y.; Wan, J.T.; Jarrett, J.T.; Drennan, C.L. Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Science* **2005**, *310*, 66–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kaufmann, S.H.; Earnshaw, W.C. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **2000**, *256*, 42–49. [[CrossRef](#)]
30. Mukherjee, S.P.; Lyng, F.M.; Garcia, A.; Davoren, M.; Byrne, H.J. Mechanistic studies of in vitro cytotoxicity of poly(amidoamine) dendrimers in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *248*, 259–268. [[CrossRef](#)]
31. Mohan, N.; Shen, Y.; Endo, Y.; ElZarrad, M.K.; Wu, W.J. Trastuzumab, but Not Pertuzumab, Dysregulates HER2 Signaling to Mediate Inhibition of Autophagy and Increase in Reactive Oxygen Species Production in Human Cardiomyocytes. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 1321–1331. [[CrossRef](#)]
32. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim. Biophys. Acta BBA* **2006**, *1757*, 509–517. [[CrossRef](#)]
33. Lucken-Ardjomande, S.; Martinou, J.-C. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C. R. Boil.* **2005**, *328*, 616–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Evtodienko, Y.V.; Teplova, V.V.; Sidash, S.S.; Ichas, F.; Mazat, J.-P. Microtubule-active drugs suppress the closure of the permeability transition pore in tumour mitochondria. *FEBS Lett.* **1996**, *393*, 86–88. [[CrossRef](#)]
35. Kidd, J.; Pilkington, M.; Schell, M.; Fogarty, K.; Skepper, J.; Taylor, C.; Thorn, P. Paclitaxel affects cytosolic Ca²⁺ signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6504–6510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mironov, K.; Ivannikov, M.; Johansson, M. [Ca²⁺]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 715–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cristofani, R.; Marelli, M.M.; Cicardi, M.E.; Fontana, F.; Marzagalli, M.; Limonta, P.; Poletti, A.; Moretti, R.M. Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mukherjee, S.P.; Byrne, H.J. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: Experimental observation and numerical simulation. *Nanomed. Nanotechnol. Boil. Med.* **2013**, *9*, 202–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cain, K.; Bratton, S.B.; Cohen, G.M. The Apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochimie* **2002**, *84*, 203–214. [[CrossRef](#)]
40. Woo, M.; Hakem, R.; Soengas, M.S.; Duncan, G.S.; Shahinian, A.; Kägi, D.; Hakem, A.; McCurrach, M.; Khoo, W.; Kaufman, S.A.; et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 806–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Debatin, K.-M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol. Lett.* **2000**, *112*, 41–48. [[CrossRef](#)]
42. Slee, E.A.; Adrain, C.; Martin, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7320–7326. [[CrossRef](#)]
43. Kovár, J.; Ehrlichová, M.; Smejkalová, B.; Zanardi, I.; Ojima, I.; Gut, I. Comparison of Cell Death-inducing Effect of Novel Taxane SB-T-1216 and Paclitaxel in Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2951–2960. [[PubMed](#)]
44. Osaki, S.; Nakanishi, Y.; Takayama, K.; Pei, X.H.; Ueno, H.; Hara, N. Transfer of IkappaBalpha gene increase the sensitivity of paclitaxel mediated with caspase 3 activation in human lung cancer cell. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2003**, *22*, 69–75. [[PubMed](#)]

45. Ueno, N.T.; Bartholomeusz, C.; Herrmann, J.L.; Estrov, Z.; Shao, R.; Andreeff, M.; Price, J.; Paul, R.W.; Anklesaria, P.; Yu, D.; et al. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 250–259. [[PubMed](#)]
46. Kim, J.Y.; Chung, J.-Y.; Lee, S.G.; Kim, Y.-J.; Park, J.-E.; Yoo, K.S.; Yoo, Y.H.; Park, Y.C.; Kim, B.G.; Kim, J.-M. Nuclear interaction of Smac/DIABLO with Survivin at G2/M arrest prompts docetaxel-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350*, 949–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Vikhanskaya, F.; Vignati, S.; Beccaglia, P.; Ottoboni, C.; Russo, P.; D’Incalci, M.; Broggin, M. Inactivation of p53 in a Human Ovarian Cancer Cell Line Increases the Sensitivity to Paclitaxel by Inducing G2/M Arrest and Apoptosis. *Exp. Cell Res.* **1998**, *241*, 96–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Huisman, C.; Ferreira, C.G.; Bröker, L.E.A.; Rodriguez, J.; Smit, E.F.; Postmus, P.E.; Kruij, F.A.E.; Giaccone, G. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 596–606. [[PubMed](#)]
49. Ofir, R.; Seidman, R.; Rabinski, T.; Krup, M.; Yavelsky, V.; Weinstein, Y.; Wolfson, M. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 636–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kulhari, H.; Pooja, D.; Shrivastava, S.; Kuncha, M.; Naidu, V.G.M.; Bansal, V.; Sistla, R.; Adams, D.J. Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23179. [[CrossRef](#)]
51. Conklin, K.A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 294–300. [[CrossRef](#)]
52. Huang, J.; Wang, S.; Lyu, H.; Cai, B.; Yang, X.; Wang, J.; Liu, B. The anti-erbB3 antibody MM-121/SAR256212 in combination with trastuzumab exerts potent antitumor activity against trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer* **2013**, *12*, 134. [[CrossRef](#)]
53. Mohsin, S.K.; Weiss, H.L.; Gutierrez, M.C.; Chamness, G.C.; Schiff, R.; DiGiovanna, M.P.; Wang, C.-X.; Hilsenbeck, S.G.; Osborne, C.K.; Allred, D.C.; et al. Neoadjuvant Trastuzumab Induces Apoptosis in Primary Breast Cancers. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2460–2468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lane, H.A.; Motoyama, A.B.; Beuvink, I.; Hynes, N.E. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 21–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hurrell, T.; Outhoff, K. The in vitro influences of epidermal growth factor and heregulin- β 1 on the efficacy of trastuzumab used in Her-2 positive breast adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Beer, T.M.; El-Geneidi, M.; Eilers, K.M. Docetaxel (Taxotere®) in the treatment of prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2003**, *3*, 261–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Collins, D.M.; O’Donovan, N.; McGowan, P.M.; O’Sullivan, F.; Duffy, M.J.; Crown, J. Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, 1788–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Pegram, M.; Hsu, S.; Lewis, G.; Pietras, R.; Beryt, M.; Sliwkowski, M.; Coombs, D.; Baly, D.; Kabbavar, F.; Slamon, D. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* **1999**, *18*, 2241–2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Baselga, J.; Norton, L.; Albanell, Y.; Kim, M.; Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2825–2831. [[PubMed](#)]



28.08.2019

mgr Monika Marcinkowska
Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, syntezie i charakterystyce badanych związków, wykonaniu zdjęć konfokalnych, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 40%.



02.09.2019

dr n. med. Maciej Stańczyk

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika

ul. Pabianicka 62

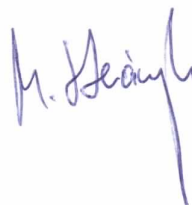
93-513 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 35%.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Stańczyk', is located in the lower right quadrant of the document.

28.08.2019

dr hab. Anna Janaszewska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

28.08.2019

dr Arkadiusz Gajek

Katedra Biofizyki Medycznej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Książak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie zmian aktywności kaspaz.

Mój wkład oceniam na 5%.

Arkadiusz Gajek

02.09.2019

mgr Małgorzata Księżak

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na wykonaniu oznaczeń poziomu reaktywnych form tlenu i potencjału mitochondrialnego.

Mój wkład oceniam na 5%

Małgorzata Księżak

02.09.2019

mgr Paula Działałak

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działałak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie faz cyklu komórkowego.

Mój wkład oceniam na 5%.

Paula Działałak

28.08.2019

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Gajka, Małgorzaty Księżak, Pauli Działak, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

B. Klajnert-Maculewicz



Multicomponent Conjugates of Anticancer Drugs and Monoclonal Antibody with PAMAM Dendrimers to Increase Efficacy of HER-2 Positive Breast Cancer Therapy

Monika Marcinkowska¹ · Maciej Stanczyk² · Anna Janaszewska¹ · Ewelina Sobierajska¹ · Arkadiusz Chworos³ · Barbara Klajnert-Maculewicz^{1,4} 

Received: 26 March 2019 / Accepted: 6 August 2019
© The Author(s) 2019

ABSTRACT

Purpose Conjugation of nanocarriers with antibodies that bind to specific membrane receptors that are overexpressed in cancer cells enables targeted delivery. In the present study, we developed and synthesised two PAMAM dendrimer-trastuzumab conjugates that carried docetaxel or paclitaxel, specifically targeted to cells which overexpressed HER-2.

Methods The ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR and RP-HPLC were used to analyse the characteristics of the products and assess their purity. The toxicity of PAMAM-trastuzumab, PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates was determined using MTT assay and compared with free trastuzumab, docetaxel and paclitaxel toward HER-2-positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines. The cellular uptake and internal localisation were studied using flow cytometry and confocal microscopy, respectively.

Results The PAMAM-drug-trastuzumab conjugates in particular showed extremely high toxicity toward the HER-2-positive SKBR-3 cells and very low toxicity towards to HER-2-negative MCF-7 cells. As expected, the HER-2-positive SKBR-3 cell line accumulated trastuzumab from

both conjugates rapidly; but surprisingly, although a large amount of PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate was observed in the HER-2-negative MCF-7 cells. Confocal microscopy confirmed the intracellular localisation of analysed compounds. The key result of fluorescent imaging was the identification of strong selective binding of the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate with HER-2-positive SKBR-3 cells only.

Conclusions Our results confirm the high selectivity of PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates for HER-2-positive cells, and demonstrate the utility of trastuzumab as a targeting agent. Therefore, the analysed conjugates present an promising approach for the improvement of efficacy of targeted delivery of anticancer drugs such as docetaxel or paclitaxel.

KEYWORDS docetaxel · HER-2 · paclitaxel · PAMAM dendrimer · trastuzumab · tumour targeting

INTRODUCTION

Since their development, researchers have recognised the potential of nanocarriers as drug delivery systems. There are two strategies by which drug delivery can be achieved with nano-systems: passive delivery, which exploits the enhanced permeability and retention effect (EPR effect) to increase the penetration of nanocarriers into solid tumours; and active delivery, which is achieved by covalent conjugation of the nanocarrier to a ligand or antibody which can bind to a specific receptor that is overexpressed in cancer cells. Previous work dedicated to anticancer drug development has focused on achieving targeted delivery to the tumour, reducing adverse effects and increasing antitumour efficacy (1).

Trastuzumab is as a recombinant, humanised Ig1 monoclonal antibody that selectively binds to human epidermal growth factor receptor 2 (EGFR2). Through binding to

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11095-019-2683-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Barbara Klajnert-Maculewicz
barbara.klajnert@biol.uni.lodz.pl

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

² Department of Surgical Oncology, Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland

³ Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-236 Lodz, Poland

⁴ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V, Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany

subdomain IV of the extracellular domain of overexpressed human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) receptors, trastuzumab blocks the receptor and inhibits excessive proliferation of HER-2-positive cancer cells. Previous research has indicated that inhibition of proliferation is a result of cell cycle arrest in the G1 phase (2). Therefore, the combination of trastuzumab and a taxane is a first-line therapy for the treatment of various cancers including lung, ovarian and metastatic breast cancer (MBC). In HER-2-positive MBC patients, three doses per week of docetaxel (100 mg/m²) given in combination with trastuzumab (at a 4 mg/kg loading dose followed by 2 mg/kg once weekly) resulted in a high overall response rate (ORR), overall survival (OS), response duration, time to progression and time to treatment failure (TTF), and the toxicity of the drug combination was only slightly increased compared with docetaxel alone (3). Similarly, paclitaxel, which is the preferred single chemotherapeutic agent for recurrent or metastatic breast cancer according to National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines (4), resulted in improved progression-free survival (PFS) of HER-2-positive patients when administered at a dosage of 80 mg/m² weekly in combination with a trastuzumab monoclonal antibody at 4 mg/kg (loading dose, followed by weekly administration of 2 mg/kg), compared with paclitaxel alone (5).

The use of dendrimers as carriers of anticancer drugs or monoclonal antibodies is well known (6). Teow *et al.* demonstrated the use of a third generation (G3) polyamidoamine (PAMAM) dendrimer as a drug carrier which increased the permeability of the poorly soluble drug, paclitaxel. Cytotoxicity studies have shown that the conjugation of lauryl chains and paclitaxel to G3 dendrimers significantly ($p < 0.05$) increased the cytotoxicity of the drug toward the human Caco-2 cell line as well as primary cultures of porcine brain endothelial cells (PBECS). The conjugate showed an approximate 12-fold increase in permeability across both the apical and basolateral cell monolayers compared with paclitaxel alone (7). Paclitaxel has also been conjugated to hydroxyl-terminated PAMAM G4 dendrimers and bispolyethylene glycol (bisPEG) polymer to achieve enhancement of drug solubility and anticancer activity. The cytotoxicity of the PAMAM dendrimer-succinic acid-paclitaxel conjugate towards A2780 human ovarian carcinoma cells was increased 10-fold compared with the free, non-conjugated drug (8). The *in vitro* studies of Miyano *et al.* have confirmed the efficacy of the monoclonal antibody conjugated to the dendrimer. The G6 PAMAM dendrimer was modified with two amino acids – lysine and glutamic acid (KG6E) – then trastuzumab and the fluorescent dye AlexaFluor 488 were attached. The results confirmed that the KG6E-trastuzumab conjugate specifically bound to SKBR-3 (HER-2-positive) cells in a dose-dependent manner, with low binding affinity for MCF-7

(HER-2-negative) cells. In addition, the conjugate was significantly internalised by SKBR-3 cells and subsequently trafficked to the lysosomes (9).

We believe that we have developed an innovative delivery system which combines both strategies. In the present study, trastuzumab was used in a PAMAM-drug-trastuzumab conjugate carrying paclitaxel (ptx) or docetaxel (doc) in order to specifically target SKBR-3 HER-2 positive cells. Over 20% of breast cancers exhibit overexpression of HER-2 human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) (10); therefore, targeting this receptor may represent an attractive target for nanoparticles loaded with anticancer drugs. Moreover, dendrimer conjugation significantly changes the biodistribution of low molecular weight drugs, affording the opportunity to achieve disease-specific targeting while reducing delivery to sites of toxicity (11). Our aim was to create a conjugate which will release the drugs when it is exposed to low pH, such as at the site of solid tumour, by breaking the pH-sensitive linker between the monoclonal antibody and PAMAM-drug conjugate. This will then enable passive delivery of paclitaxel or docetaxel.

For this purpose, we analysed the cytotoxicity of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates in HER-2-positive (SKBR-3) and -negative (MCF-7) human breast cancer cells. The internalisation efficiencies and cellular trafficking were determined in order to evaluate the potential application of PAMAM dendrimers as HER-2-targeted fluorescently-labelled drug carriers. Our results indicate that PAMAM-drug-trastuzumab conjugates have increased toxicity toward HER-2-positive human breast cancer cells compared with the free drug or the PAMAM-trastuzumab conjugate. Therefore, our new conjugates could represent potential candidates for HER-2-expressing tumour targeting, and may pave the way for improvements in the effectiveness of therapy for this condition, which is the most common cancer in women.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Solvents for the synthesis and purification were purchased from Sigma-Aldrich. All cell culture reagents were purchased from Gibco® (Germany). Flasks and multiwell plates for *in vitro* studies were obtained from Nunc (Germany). Amine terminated PAMAM G4 dendrimer, docetaxel/paclitaxel, PBS (phosphate buffered saline), FBS (fetal bovine serum) and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma-Aldrich. Trypan blue was purchased from Molecular Probes (USA). Herceptin (trastuzumab) was obtained from Roche Poland. Human breast adenocarcinoma's cell lines: HER-2 negative (MCF-7

ATCC no. HTB-22) and HER-2 positive (SKBR-3 ATCC no. HTB-30) were purchased from ATCC (USA).

Synthesis of PAMAM Docetaxel/Paclitaxel Conjugate

The linking of the drug to the dendrimer was done using a two steps covalent method (patent pending P.420273).

Shortly, 12.5 μmol of drug (docetaxel or paclitaxel) was dissolved in 3 ml of anhydrous DMSO at 25°C and 3-fold molar excess of *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) was added. The mixture was stirred 0.5 h. Then 25 μmol of succinic acid was slowly added to the solution while maintaining the reaction mixing. The reaction was then stirred for 24 h. Khandare *et al.* showed that the use of EDC and other carbodiimides could be also appropriate for the synthesis of biomolecules and their functionalization with other molecules, therefore we chose the EDC/carbodiimides system instead of succinic anhydride (12). The choice of anhydrous DMSO as a synthesis solvent was determined by the high solubility of paclitaxel and docetaxel in it, as well as other reagents. Using the anhydrous DMSO, we performed the reactions in an inert gas atmosphere, as previously published (13,14).

Resulting drug-SA was stirred for 3 h at room temperature in the presence of 20 μmol of EDC. Then 1 mL of PAMAM G4 solution in methanol was evaporated in order to remove methanol and then was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 2 days.

The PAMAM G4-drug was purified by ultrafiltration on an Amicon Ultra-3 K (molecular weight cut-off, MWCO = 3 kDa). ^1H NMR, ^{13}C NMR and FTIR was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM and docetaxel/paclitaxel conjugation. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance III DRX-600 and 500 MHz spectrometers, using deuterated DMSO-*d*6 as solvents. The FTIR spectra were collected with a FTIR ATI Mattson Spectrometer Spectrum and samples were measured as thin film in KBr crystals. The analytical data can be found in the supplementary material.

Synthesis of PAMAM-Doc-Trastuzumab and PAMAM-ptx-Trastuzumab Conjugate

The synthesis of PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate was performed according to the patented method (patent pending P.421440 P.420274).

Activation of Trastuzumab. SMCC was dissolved in a small volume of DMF, and diluted by adding 0.1 M PBS (phosphate buffered saline) pH 7.6, which contains 5 mM EDTA to obtain 1 mg/ml. The solution was added to trastuzumab. The mixture was incubated for 1 h at room temperature (RT). In the next step product was purified

and buffer-exchanged into PBS pH 7.0, with Amicon Ultra-30 K column (MWCO = 30 kDa).

Introduction of Thiol Groups for the PAMAM G4 Dendrimer Surface. Traut's reagent converts primary amine into thiol in the range of pH 7–10, however its half-life in solution decreases as the pH increases. Modification with Traut's reagent (2-iminothiolane) is very efficient and occurs rapidly at slightly basic pH. To introduce thiol groups into G4 dendrimer surface, the primary amine groups were reacted with a 10:1 mol excess of Traut's reagent in 0.1 M PBS buffer, at room temperature under N_2 for 1 h pH 8.0. Thiolated PAMAM G4 was purified and buffer exchanged into PBS, pH 7.0 by ultrafiltration on an Amicon Ultra-3 K column.

The Reaction of the Modified PAMAM G4 Dendrimer with the Activated Trastuzumab. Derivatized trastuzumab was reacted with thiolated PAMAM G4 dendrimer at a 1:12 M ratio. The reaction was conducted in PBS, pH 7.0 at 25°C for 24 h. Finally, the PAMAM-trastuzumab conjugate was purified from the excess of thiolated PAMAM G4 by Amicon Ultra-30 K (MWCO 30 kDa). The final stoichiometric ratio for PAMAM-drug-trastuzumab conjugate was 1:1:1.

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM and trastuzumab conjugation. Solvents used for HPLC analysis were at the HPLC grade; $^i\text{PrOH}$, MeOH, MeCN was from Sigma-Aldrich, trifluoroacetic acid from J.T.Baker (9470) and Milli-Q water. All experiments were performed on two FPLC/HPLC systems: (1) AKTA Purifier two pumps system equipped with UV-900 monitoring, pH and conductivity probe and fraction collector Frac-920. Analysis using AKTA was performed at room temperature 25°C, (2) Shimadzu Prominence UFLC system equipped with LC-20 AD isocratic pumps with RF-20A fluorescence detector, SPD-M20A diode array detector for UV-Vis monitoring and CTO-20ASvp column oven that was setup at 75°C. Initially SOURCE uRPC C2/C18 ST 4.6/100 column was used, but it appeared to be too hydrophobic for dendrimer and antibody analysis, therefore for all presented results Jupiter 4u Proteo 90A 2.0/100 column was used.

Synthesis of FITC Labeled Docetaxel/Paclitaxel and PAMAM-ptx/PAMAM-Doc Conjugate

The linking of FITC to the dendrimer was done using a two steps covalent method. Shortly, 6 μmol of drug (docetaxel or paclitaxel) was dissolved in 2 ml of anhydrous DMSO at 25°C and 3-fold molar excess of EDC was added. The mixture was stirred 3 h. Then 7 μmol of FITC was slowly added to the drug solution while maintaining the reaction mixing. The

reaction mixture was stirred for 24 h. To obtain PAMAM-drug-trastuzumab conjugate 5,6 μmol of PAMAM G4 was added to resulting products: FITC labeled docetaxel and FITC labeled paclitaxel and stirred at room temperature for 2 days. Then the trastuzumab was reacted and the product was purified as described earlier. The final stoichiometric ratio for drug:FITC conjugate was 1:1 and for PAMAM-drug-trastuzumab-FITC conjugate 1:1:1:1.

The conjugates contained FITC were purified by ultrafiltration on an Amicon Ultra-3 K (molecular weight cut-off, MWCO = 3 kDa). ^1H NMR and ^{13}C NMR were used to analyze the purity of products and to ascertain the level of FITC conjugation. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance III DRX-600 and 500 MHz spectrometers, using deuterated DMSO-*d*6 as solvents.

Cell Culture

HER-2 negative human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell line was grown in DMEM medium supplemented with GlutaMAX and 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS). HER-2 positive human breast adenocarcinoma (SKBR-3) cell line was grown in McCoy's5 medium supplemented GlutaMAX and 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS). Cells were cultured in T-75 culture flasks in a humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 at 37°C and subcultured every 2 or 3 days. Cells were harvested and used in experiments after obtaining 80–90% confluence. The number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay with the use of Countess Automated Cell Counter (Invitrogen). Cells were seeded in flat bottom 96-well plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 μL of an appropriate medium. After seeding, plates were incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 at 37°C in order to allow cells attaching to the plates.

Determination of Cytotoxicity

The influence of the PAMAM dendrimer conjugates and free docetaxel or paclitaxel on the cell viability was determined with the use of the MTT-assay. Briefly, to the 96-well plates containing MCF-7 and SKBR-3 cells at the density of 2.0×10^4 cells/well in appropriate medium different concentrations of all compounds were added. Cells were incubated with the dendrimer for 24 h in a 37°C humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 . After the incubation cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). Next, 50 μL of a 0.5 mg/mL solution of MTT in PBS was added to each well and cells were further incubated under normal culture conditions for 4 h. After incubation the residue MTT solution was removed and the obtained formazan precipitate was dissolved in DMSO (100 μL /well). The conversion of the tetrazolium salt

(MTT) to a colored formazan by mitochondrial and cytosolic dehydrogenases is a marker of cell viability. Before the absorbance measurement plates were shaken for 1 min and the absorbance at 570 nm was measured using the PowerWave HT Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA).

Determination of Hemolysis

The influence of the PAMAM dendrimer conjugates on the hemolysis was determined with the spectrophotometric method used previously (15). Briefly, human blood from healthy adult donors was obtained from a local blood bank. Blood was centrifuged for 10 min at 400 g to remove serum and buffy coat. Next, erythrocytes were washed four times with ten volumes of PBS buffer (pH = 7.4), followed by centrifugation for 10 min at 400 g. Erythrocytes were suspended in PBS buffer, the hematocrit was measured and erythrocytes suspension was diluted to the hematocrit of 2%. Erythrocyte suspension was mixed with analyzed compounds solutions in the same buffer to obtain final 1 μM concentration. Samples were incubated for 24 h and 48 h in 37°C. Next, samples were centrifuged at 400 g for 10 min. Supernatant was removed and the absorbance of supernatant at 540 nm was measured. For positive and negative control erythrocytes suspensions in distilled water and in PBS were used, respectively. The hemolysis amount was calculated from the equation:

$$\text{Hemolysis}\% = \frac{(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{negative control}})}{(\text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{negative control}})} \times 100\%$$

For comparison, the same experiment was performed for free docetaxel and paclitaxel.

Cellular Uptake Detection

In vitro uptake studies were carried out using FITC labeled docetaxel or paclitaxel and PAMAM-doc-trastuzumab or PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate. Compounds were added at a final concentration of 0.1 μM to the 12-well plates containing MCF-7 and SKBR-3 cells at the density of 1.5×10^4 cells/well. In this study cells were incubated with the compounds for a specific time in a range from 1 h to 48 h in humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 at 37°C. After the appropriate incubation cells were washed with PBS, suspended in 500 μL of medium and immediately analyzed with a Becton Dickinson LSR II flow cytometer (BD Biosciences, USA) using a blue laser - 488 nm and PE bandpass filter - 575/26 nm.

Confocal Microscopy

Confocal microscopy images were obtained with confocal inverted microscope SP-8, Leica equipped with 405 nm laser

(Leica, DE). Cells at the density of 1×10^4 cells/well (SKBR-3) and 0.75×10^4 cells/well (MCF-7) were seeded on 96-well glass-bottom plates and incubated with $0.1 \mu\text{M}$ FITC labeled docetaxel or paclitaxel or PAMAM-doc-trastuzumab or PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate for 24 h in 37°C humidified atmosphere containing 5.0% CO_2 . After the incubation, cells were cooled on ice and washed once with cold phosphate buffered saline (PBS) to inhibit endocytosis. Cells were imaged to visualize fluorescence of FITC labeled docetaxel or paclitaxel in green channel (excitation 488 nm, emission 520 nm) and in transmitted light.

Statistical Analysis

Data was expressed as mean $\pm$ SD. Analysis of variance (ANOVA) with the Tukey post hoc test was used for results comparison. All statistics were calculated using the Statistica software (StatSoft, Tulsa, USA), and p values <0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterisation of the Conjugates

We have developed an innovative delivery system consisting of three components, each of which plays a different role. Trastuzumab provides specificity against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2), which is overexpressed in various cancers including breast cancer; taxanes (docetaxel and paclitaxel) provide cytotoxic effects and the PAMAM dendrimer protects the whole conjugate in the circulatory system and provides specific drug release in the tumour environment when linked with an anticancer drug via a pH-sensitive linker. Yabbarov *et al.* has confirmed the dependence drug release on decreasing pH (16). He observed that pH-dependent linkages are hydrolysed in the environment of the tumour to release the drug, which enables controlled administration of the active substance at the chosen site by exploiting the natural properties of tumour cells: high metabolism and acidic pH. We decided to link docetaxel or paclitaxel to the PAMAM dendrimer using succinic acid (SA) (17). Figure 1 illustrates the steps of synthesis of the PAMAM-drug-trastuzumab conjugate.

The chemical structures of PAMAM-doc and PAMAM-ptx were characterised by ^1H NMR, ^{13}C NMR analysis and FTIR spectroscopy (analytical data can be found in the supplementary material).

For clarity of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra, Fig. 2 presents the structures of drugs (a. paclitaxel, b. docetaxel) with the marked number of carbon atoms.

The structure of paclitaxel-FITC, PAMAM-ptx-FITC, docetaxel-FITC and PAMAM-doc-FITC was confirmed by their ^1H -NMR spectra using 500 MHz Bruker AVANCE instrument in 310 K. Chemical shifts are reported in ppm downfield from TMS using $\text{DMSO}-d_6$ as a solvent.

Figure 3 (upper panel) presents the ^1H -NMR spectrum for paclitaxel-FITC. Proton signals occurring for drug appear for H_{17} at 0.99 ppm, H_{16} at 1.09 ppm, H_{19} at 1.48 ppm, H_{18} at 1.77 ppm, H_{14} at 1.89 ppm, H_{10} at 2.09 ppm, H_4 at 2.21 ppm, H_3 at 3.58 ppm, H_{20} at 4.01 ppm, H_7 at 4.09 ppm, OH_1 at 4.69 ppm, H_5 at 4.90 ppm, $\text{H}_{3'}$ at 5.37 ppm, H_2 at 5.40 ppm, $\text{H}_{2'}$ at 4.55 ppm, H_{13} at 5.88 ppm, H_{10} at 6.27 ppm, m-Bz₂ at 7.61 ppm, p-Bz₂ at 7.71 ppm, o-Bz₂ at 7.96 ppm, o-NHBz at 7.48 ppm, o-NHBz at 7.55 ppm, o-NHBz at 7.83 ppm, p-Ph_{3'} at 7.23 ppm, o-Ph_{3'} at 7.37 ppm, m-Ph_{3'} at 7.37 ppm, NH at 8.93 ppm. Aromatic signals for FITC (associated with aromatic protons atom adjacent to phenol group) appear at 6.52–6.62 ppm. Signals from –NHCS– appear at 10.65 ppm. Moreover, $\text{H}_{2'}$ proton peak on the ^1H NMR spectra was shifted to 5.87 ppm. In the ^{13}C NMR spectrum (Fig. 3 lower panel) we observed chemical shift of C2' to 80.91 ppm.

Figure 4 (upper panel) presents the ^1H -NMR spectrum for docetaxel-FITC. Proton signals occurring for drug appear for H_{17} at 0.99 ppm, H_{16} at 1.01 ppm, OC-CH₃ at 1.36 ppm, H_{19} at 1.52 ppm, H_{18} and H_{14} at 1.74 ppm, H_6 at 1.92 ppm, -O-CO-CH₃ at 2.28 ppm, H_3 at 3.66 ppm, H_{20} at 4.03 ppm, H_7 at 4.33 ppm, H_5 at 4.90 ppm, H_{10} at 4.98 ppm, $\text{H}_{3'}$ at 5.04 ppm, NH at 5.09 ppm, H_2 at 5.42 ppm, C_{13} at 5.90 ppm, o-, m-, p- Ph_{3'} at 7.37 ppm, m-Bz₂ at 7.62 ppm, p-Bz₂ at 7.71 ppm, o-Bz₂ at 7.97 ppm. Aromatic signals for FITC (associated with aromatic protons atom adjacent to phenol group) appear at 6.55–6.70 ppm and 7.81–7.90 ppm. Signals from –NHCS– appear at 10.68 ppm. Moreover, $\text{H}_{2'}$ proton peak on the ^1H NMR spectra was shifted to 5.86 ppm. In the ^{13}C NMR spectrum (Fig. 4 lower panel) we observed chemical shift of C2' to 80.89 ppm.

Figure 5 (upper panel) presents the ^1H -NMR spectrum for PAMAM-ptx-FITC ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, ppm). Proton signals for PAMAM dendrimer appear at 2.17 ppm for –CH₂–C(O)–NH, 2.38 ppm for –CH₂–N–, 2.55–2.60 ppm for –N–CH₂–, 3.04–3.13 ppm for –CH₂–NH₂ and –C(O)NH–CH₂, 7.92 ppm for –CONH. Aromatic signals for paclitaxel and FITC appear at (δ (ppm) $\approx$ 7.14–7.65). Moreover, $\text{H}_{2'}$ proton peak for paclitaxel was shifted to 5.81 ppm, and signal for NH group at 8.48 ppm. The number of paclitaxel molecules conjugated with PAMAM dendrimer was calculated using the proton integration method. Unfortunately, it is very difficult to confirm the results of conjugation by ^{13}C NMR spectrum (Fig. 5 lower panel) due the small concentration of the sample and too big molar mass difference between the drug and the PAMAM dendrimer. We can only presume that signal at 84.30 comes from the bond between the drug and the dendrimer.

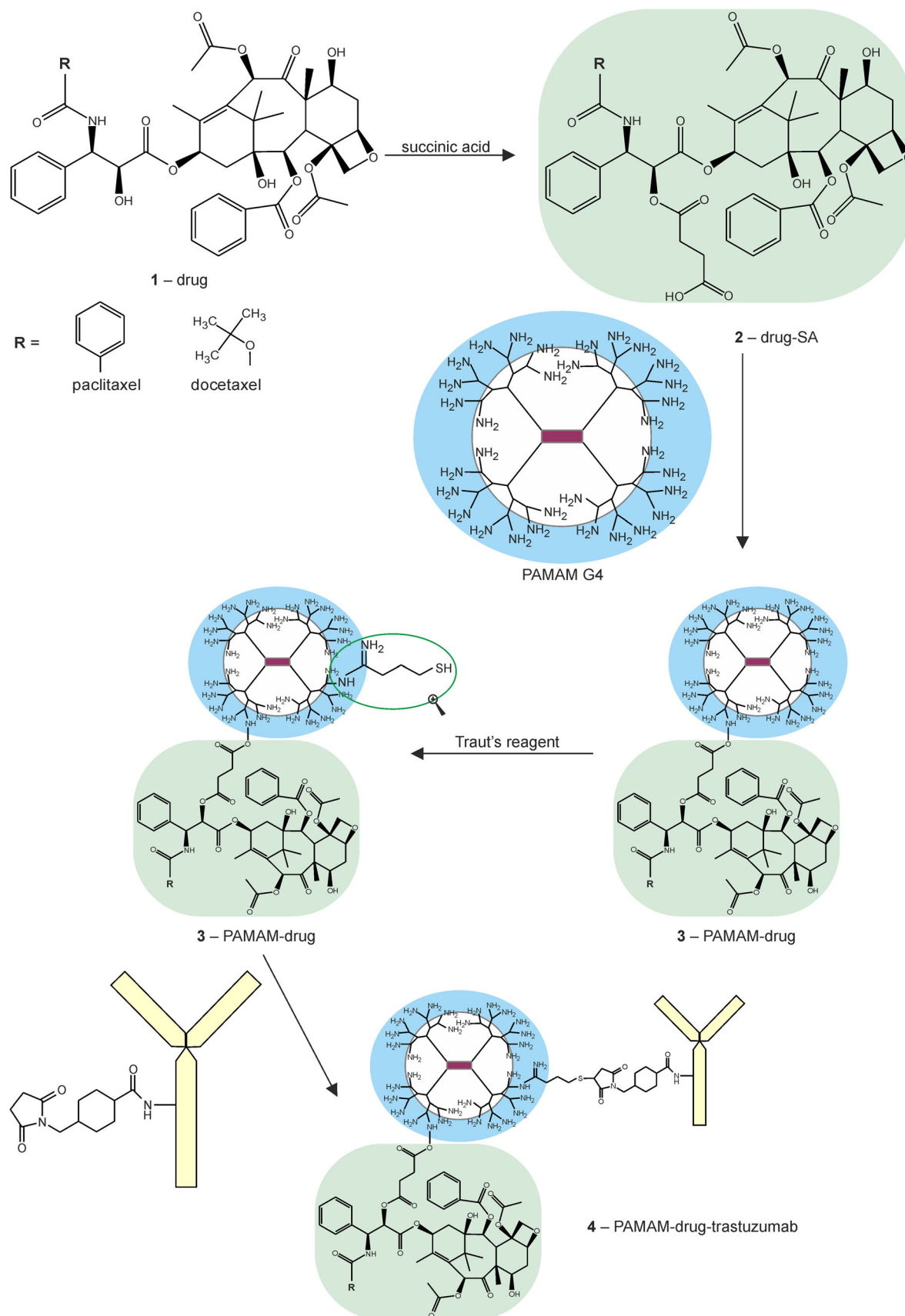


Fig. 1 Synthesis of the PAMAM-drug-trastuzumab conjugate

Fig. 2 The structures of drugs: (a) paclitaxel, (b) docetaxel

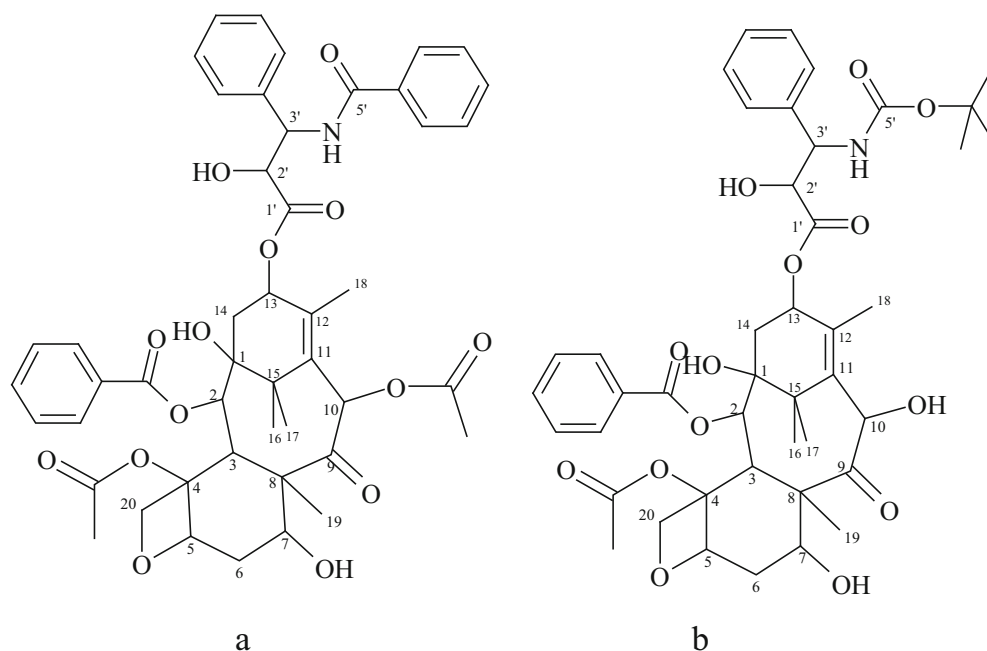


Figure 6 (upper panel) presents the ^1H -NMR spectrum for PAMAM-doc-FITC (DMSO- d_6 , 300 MHz, ppm). Proton signals for PAMAM dendrimer appear at 2.16 ppm for $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$, 2.38 ppm for $-\text{CH}_2-\text{N}-$, 2.55–2.60 ppm for $-\text{N}-\text{CH}_2-$, 3.04–3.13 ppm for $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ and $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2$, 7.92 ppm for $-\text{CONH}$. Aromatic signals for docetaxel and FITC appear at (δ (ppm) $\approx$ 7.17–7.69). Moreover, H2' proton peak of docetaxel was shifted to 5.84 ppm, and signal for NH group at 8.46 ppm. The number of docetaxel molecules that conjugated with PAMAM dendrimer was calculated using the proton integration method. Also in this case ^{13}C NMR spectrum (Fig. 6 lower panel), due the small concentration of sample and too big molar mass difference between the drug and the PAMAM dendrimer, allows only to presume that the signal at 84.68 comes from the bond between docetaxel and the PAMAM dendrimer.

In the next step, PAMAM-doc and PAMAM-ptx conjugates were conjugated to the monoclonal antibody (trastuzumab). To accomplish this, we used a succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) linker, which provides a convenient crosslinking agent for amino and thiol groups. The NHS esters react with primary amines to form stable amide bonds and the maleimide part reacts with sulfhydryl groups to form stable thioethers. To carry out the crosslinking reaction, we modified the amine groups of the PAMAM dendrimer into thiols using 2-iminothiolane (Traut's reagent). Modification with Traut's reagent is very efficient and rapid at a slightly basic pH (18).

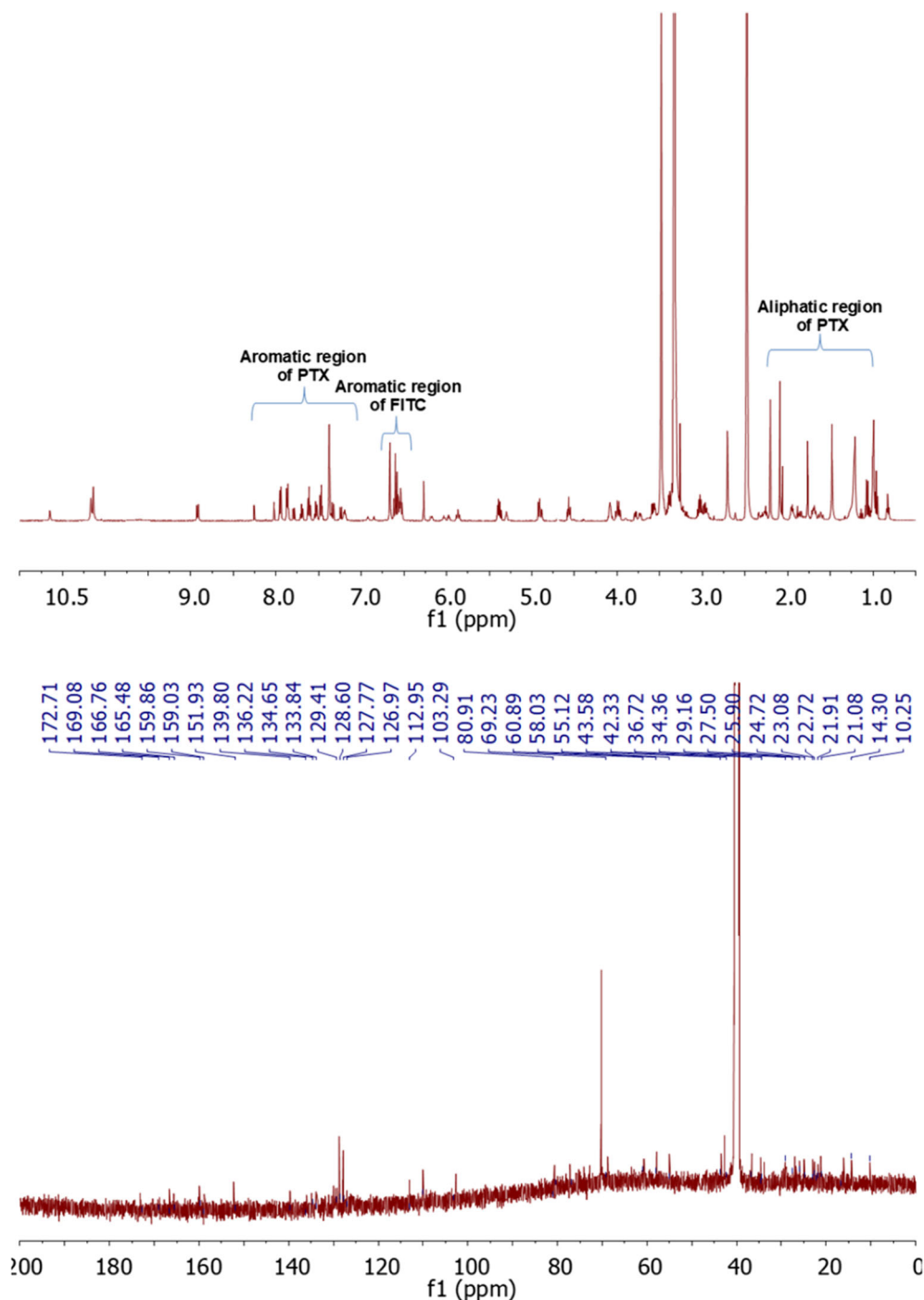
The conjugates were characterised using FPLC/HPLC analysis. Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyse the purity of products and to ascertain the degree of PAMAM and trastuzumab

conjugation. Initially, a water/acetonitrile elution system was used, but improved performance was achieved with the modified buffer: A: 0.1% TFA in water, B: 70% $^i\text{PrOH}$, 20% MeCN, 0.1% TFA in water. Elution was typically performed using a gradient of 0–80% B over 30 min, followed by 80–100% B in 5 min, then 100% B for 10 min and finally 100–0% B in 5 min (Fig. 7a). Samples were typically injected as 20–100 μg of material suspended in 100 μL of buffer A. The PAMAM dendrimer has been reported to absorb at 214 nm, and so absorbance at this wavelength along with 280 nm (to detect protein) were recorded. We also monitored absorbance at 254 nm to measure any potential contamination. Additionally, a Shimadzu diode array system provided UV profiles (recorded at 200–600 nm). This allowed the purity of PAMAM dendrimer to be ascertained, by its absorbance at 220 nm has also been reported previously. The analytical data can be found in the supplementary material.

In the second step, analysis of trastuzumab was carried out. Analysis was performed on a UFLC system (composed of two LC-20ADXP isocratic pumps, a CTO-20AS column oven with diode array UV-Vis monitoring) operated at 75°C. The elution system was as before (A: 0.1% TFA in water, B: 70% $^i\text{PrOH}$, 20% MeCN, 0.1% TFA in water). The system was run at a gradient of 0–80% B over 30 min to elute the main product (monitored at 280 nm), which appeared at 18.3 min. The UV profile of the main signal showed absorbance at 277 nm, as is expected for proteins (Fig. 7b).

Finally, the PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates were analysed. Analysis of the chromatography profiles showed absorption at 280 nm. Analysis was carried out as before at 75°C, using buffers A: 0.1% TFA in water, B: 70% $^i\text{PrOH}$, 20% MeCN, 0.1% TFA in water;

Fig. 3 The ^1H -NMR spectrum of paclitaxel-FITC (upper panel) and the ^{13}C -NMR spectrum of paclitaxel-FITC (lower panel)



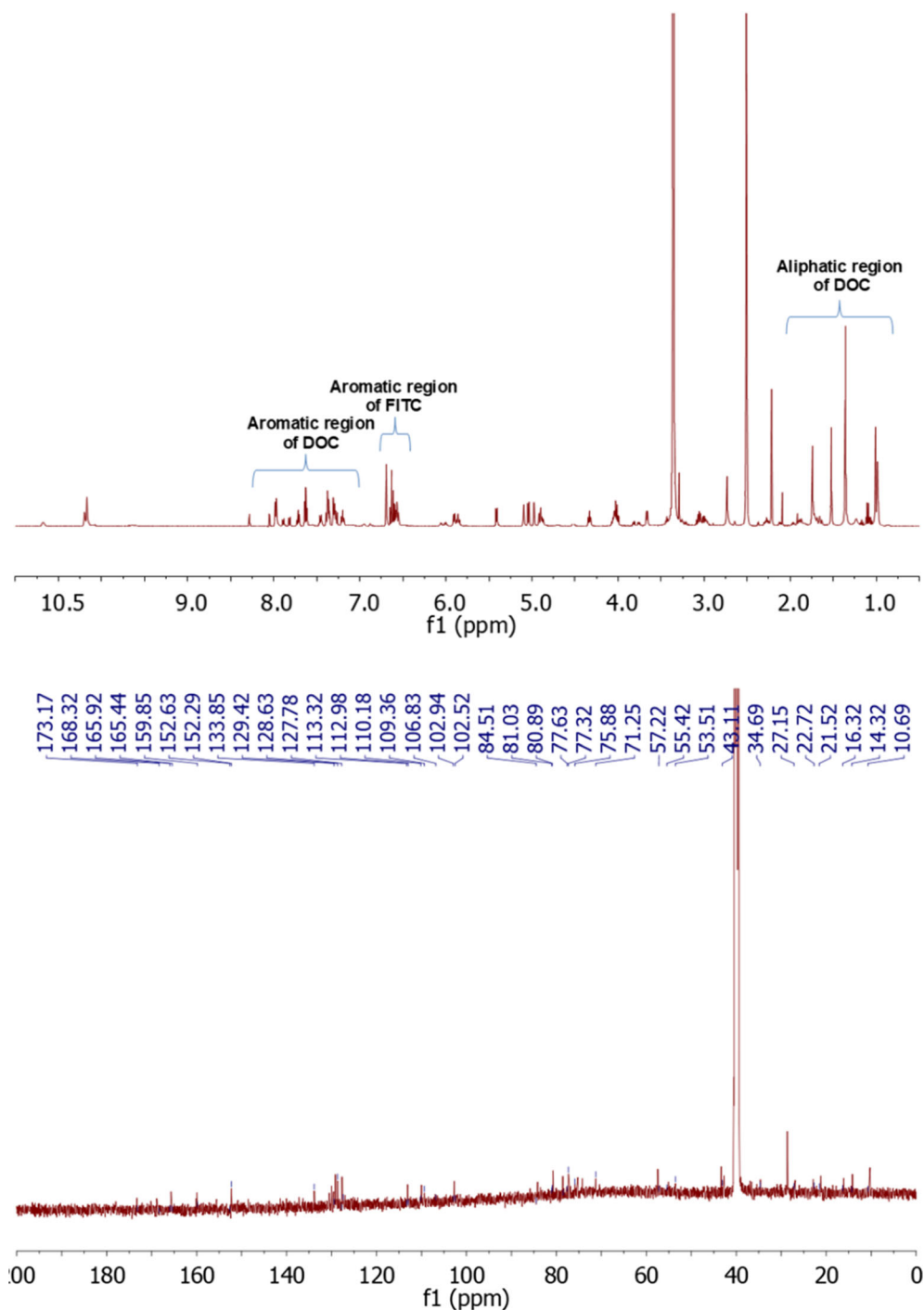
and a gradient of 0–80% B over 30 min, following injection of 100 μg of sample. The UV profile of the signal at 21 min shows three peaks (Fig. 8). As expected, absorbance signals were observed at 276, 504 and 540 nm, which are characteristic of proteins, docetaxel or paclitaxel, respectively.

In Vitro Studies

There are examples of PAMAM dendrimer conjugated with various anticancer drugs reported (16,17), but few involve the

use of a monoclonal antibody as a disease-specific targeting agent (18–20). In this study, the PAMAM dendrimer was conjugated to trastuzumab using a pH-dependent linker which can be applied for drug conjugation because the linker-bonded conjugates are stable in the extracellular media. This ensures low drug release, but lability when the conjugates enter the lysosomes which allows release of the drug to elicit its antitumour activity (11,21). In the present study, the number of drug molecules per PAMAM dendrimer molecule was calculated to be 1.0. The biocompatibility of the PAMAM-doc-

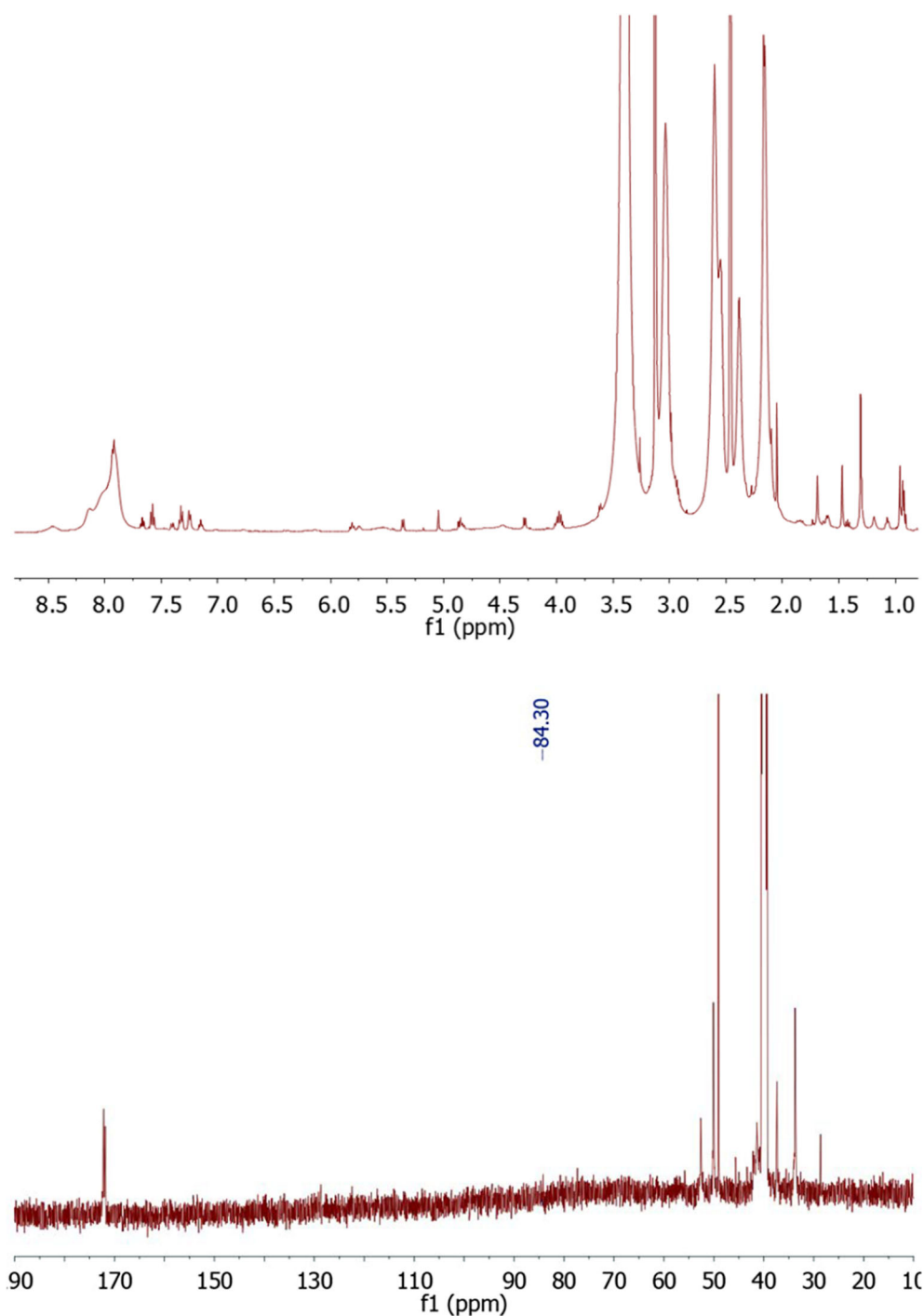
Fig. 4 The ^1H -NMR spectrum of docetaxel-FITC (upper panel) and the ^{13}C -NMR spectrum of docetaxel-FITC (lower panel)



trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates was evaluated using the MTT assay to measure the cytotoxicity in two different breast cancer cell lines: HER-2-negative human breast adenocarcinoma (MCF-7) and HER-2-positive human breast adenocarcinoma (SKBR-3). Measurements were made after 24 and 48 h of incubation and after a 24-h incubation with the drug, removal of drug, and another 24-h incubation without drug (24-24 h). The addition of this incubation variant allows to assess cell damage and mortality after

the drug removing from the system. Figure 9 shows the cell viability profiles that were obtained for each conjugate compared with the free drug for both cell lines. The cytotoxicity of docetaxel and paclitaxel was dose-dependent, with IC_{50} values of around 23.7 and 7.8 μM (respectively) after a 24-h incubation in the MCF-7 cell line, and 10.7 and 7.3 μM (respectively) after a 24-h incubation in the SKBR-3 cell line. In contrast, trastuzumab itself exhibited very low toxicity even toward SKBR-3 cells, with cell viability observed to be over

Fig. 5 The ^1H -NMR spectrum of PAMAM-ptx-FITC (upper panel) and the ^{13}C -NMR spectrum of PAMAM-ptx-FITC (lower panel)

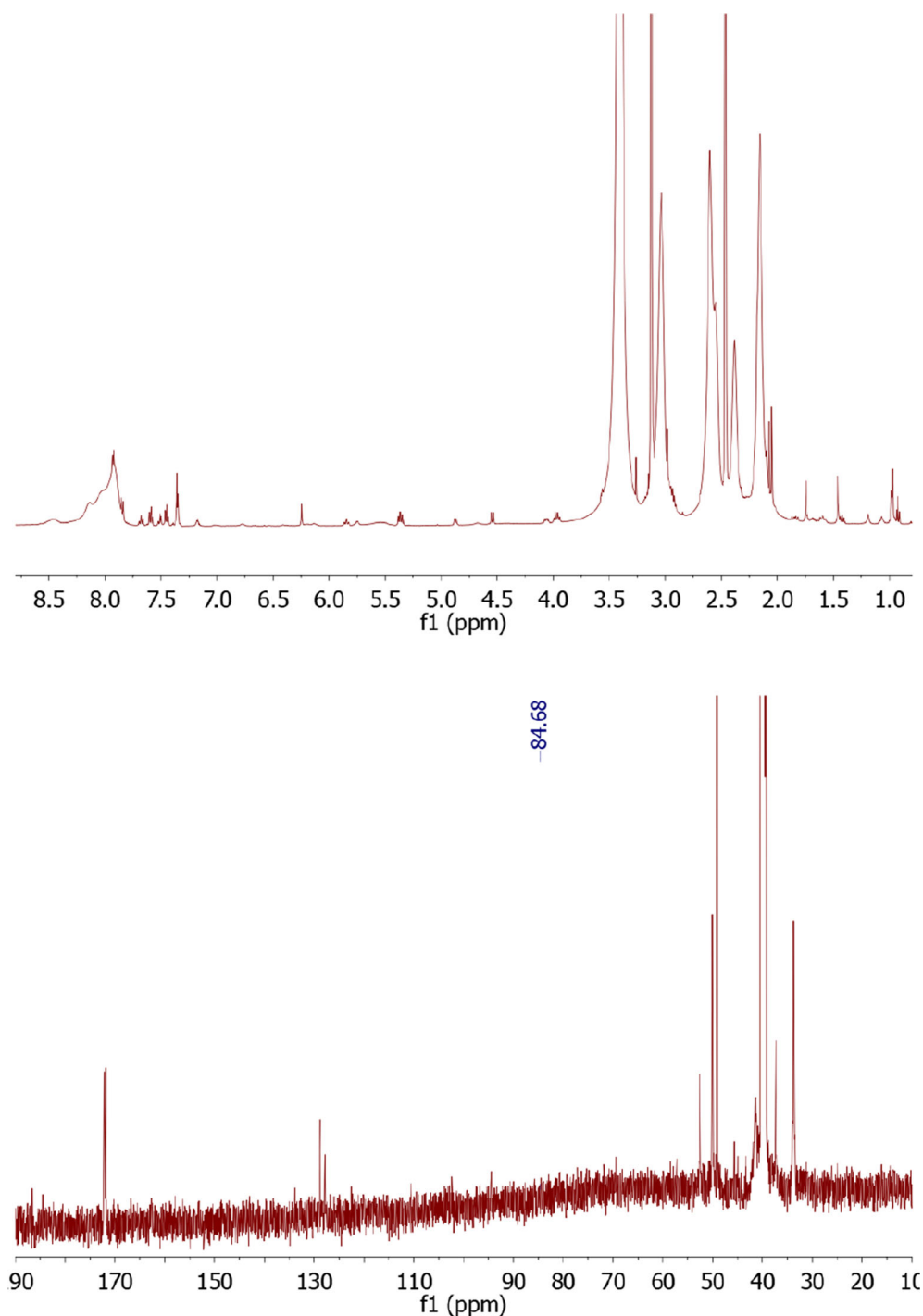


85% following exposure to 20 μM concentration of the drug. However, conjugation of antibody with PAMAM dendrimer improved that cytotoxic effect (results published earlier (14)). The observed effect was more evident for SKBR-3 cells than MCF-7 cells, due to selective binding of the conjugate to cells that overexpress HER-2. These results are in good agreement with previous studies (Miyano *et al.*), that showed that when the glutamate-modified sixth generation lysine dendrimer (KG6E) was conjugated with trastuzumab, binding with the

HER-2 receptor was more specific and exhibited a higher cellular internalisation rate compared with the free monoclonal antibody (9). Other studies have confirmed the lack of antiproliferative activity of free trastuzumab toward different HER-2-positive cell lines (22).

Importantly, the addition of taxanes to the PAMAM-trastuzumab conjugate enhanced the therapeutic effect and selectivity of the conjugates in comparison with the free drugs. This was particularly obvious after 48 h of incubation and

Fig. 6 The ^1H -NMR spectrum of PAMAM-doc-FITC (upper panel) and the ^{13}C -NMR spectrum of PAMAM-doc-FITC (lower panel)



after 24-24 h. The IC_{50} values (Table I) in SKBR-3 cells indicate that both PAMAM-drug-trastuzumab conjugates showed increased selectivity and therapeutic effects compared with the free drugs, but the most remarkable result of the present study is the selectivity that was observed between cell lines. The PAMAM-doc-trastuzumab conjugate in particular showed extremely high toxicity toward the HER-2-positive SKBR-3 cells and very low toxicity towards to HER-2-negative MCF-7 cells.

Our results confirm the uniqueness of the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates, and reveal a synergistic effect: an increase in the toxic efficiency towards to HER-2-positive cells (SKBR-3) and a decrease in the toxic efficiency towards to HER-2-negative cells (MCF-7). These results present the possibility of significant dose reduction while maintaining the therapeutic effect and selectivity, which can protect from the adverse effects caused by administration of docetaxel or paclitaxel.

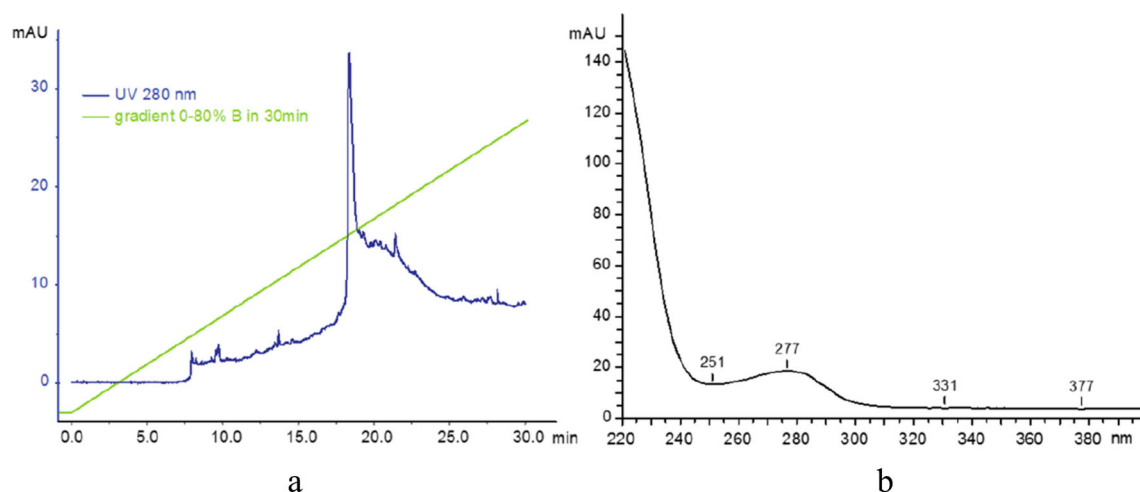


Fig. 7 (a) Reverse-phase high performance liquid chromatography profile of trastuzumab. (b) Ultraviolet profile of the main signal at 18 min

This finding is in agreement with a previous study by Rodalleg *et al.*, which reported the association between cytotoxicity and cellular uptake and the level of HER-2 expression. Immunoliposomes containing docetaxel encapsulated in a stealth liposome and engrafted with trastuzumab showed higher antiproliferative efficacies and efficient drug delivery compared with the standard combination of docetaxel and trastuzumab (22). Furthermore, Kulhari *et al.* confirmed the effectiveness of dendrimer-conjugated monoclonal antibodies and anticancer drugs. Even at very low concentrations (7.8 ng/mL), the trastuzumab-dendrimer-docetaxel conjugate showed significantly higher cytotoxicity against HER-2-positive MDA-MB-453 cells than the dendrimer-docetaxel conjugate, with no significant difference in cytotoxicity observed toward HER-2-negative MDA-MB-231 cells (19). These results demonstrate that trastuzumab can specifically target and successfully deliver docetaxel to HER-2-positive cells.

Many clinical trials have shown that intravenous injection is probably the most convenient way to deliver drugs conjugated with dendrimers (23). Unfortunately, very often lysis of red blood cells excludes intravenous delivery of the dendrimer conjugates. PAMAM dendrimers with exposed terminal cationic surface groups possess hemotoxic properties because they are able to disrupt cell membrane of erythrocytes after adhesion to the cell surface by electrostatic attraction and formation of holes in the membrane (24). Modification of dendrimer surface groups is one of the methods used to reduce dendrimer toxicity (15). Therefore, to assess the biocompatibility of the all analysed compounds we have evaluated their hemotoxicity. The ability of the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates to cause hemolysis was compared with the hemolytic activity of free drugs (Fig. 10). The paclitaxel and docetaxel are known to possess minor hemolytic properties contrary to amino-terminated PAMAM dendrimer generation 4.

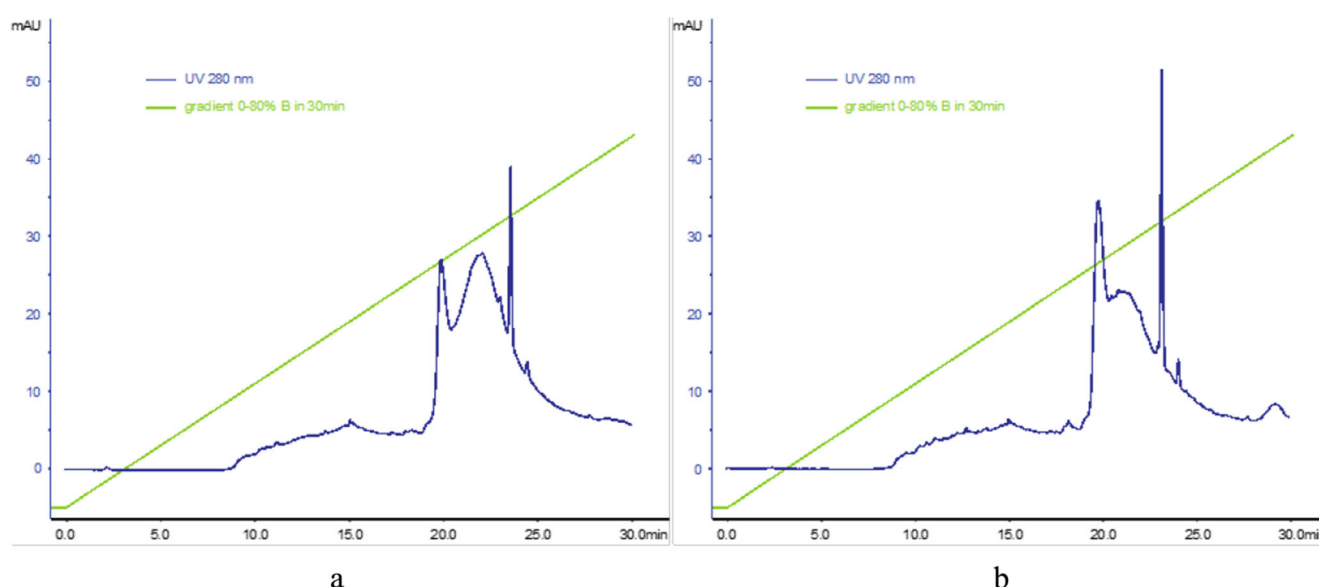


Fig. 8 Reverse-phase high performance liquid chromatography profiles of (A) PAMAM-doc-trastuzumab conjugate (a) and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate (b)

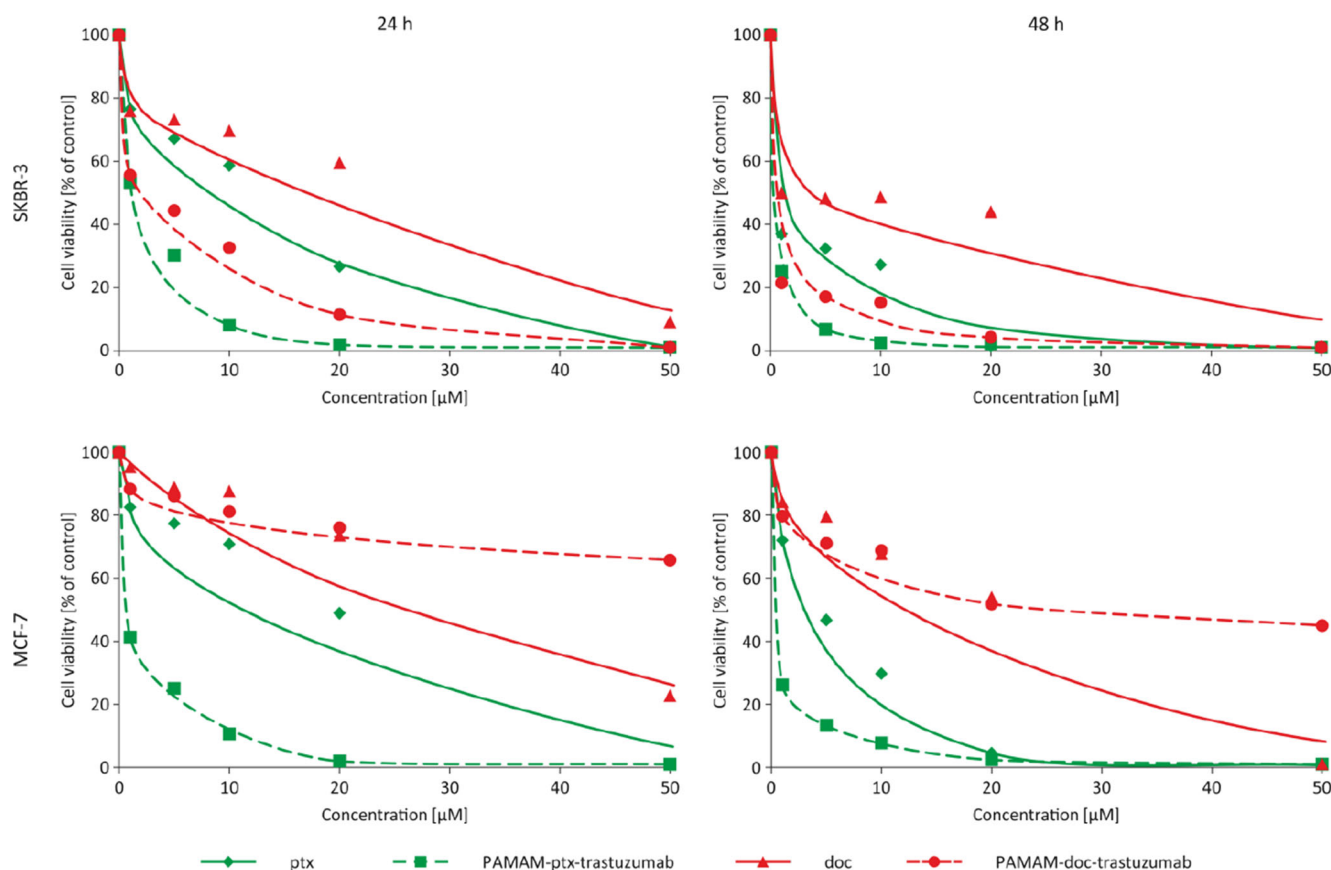


Fig. 9 Influence of paclitaxel (green rhombus), docetaxel (red triangles), PAMAM-ptx-trastuzumab (green squares) and PAMAM-doc-trastuzumab (red spheres) conjugates on the viability of MCF-7 and SKBR-3 cells as assessed by MTT assay

Under the applied experimental conditions free drugs caused 1–2% hemolysis after 24 h-incubation. PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugates were able to evoke 2.4 and 2.5% hemolysis, respectively. After 48 h of incubation with the above-mentioned conjugates, less than 10% and 12% of hemolysis was observed, respectively. In conclusion, the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates possess higher hemotoxicity than free drugs but it is very likely that this level will be lower in the presence of plasma proteins. Klajnert *et al.* showed that presence of HSA in the same concentration as under physiological conditions significantly reduced the amount of hemolysis caused by PAMAM

dendrimers (25). Moreover, the conjugates are not expected to circulate in blood as long as 48 h.

In this study, FITC was used to label free drugs and the dendrimer conjugated to anticancer drugs via a pH-dependent linker. The molar ratio of FITC molecules to PAMAM in the conjugate was 1:1. This method of conjugation ensured stability of the conjugates in the extracellular media and high intercellular drug release catalysed by lysosomal enzymes, what resulted in increased antitumour activity. In order to analyse the cellular uptake of free docetaxel, paclitaxel and the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates by flow cytometry, cells were incubated with the compounds at

Table 1 Comparison of IC_{50} values for paclitaxel, docetaxel, PAMAM-ptx-trastuzumab and PAMAM-doc-trastuzumab conjugates in two breast cancer cell lines

	MCF-7 24 h	MCF-7 24 h–24 h	MCF-7 48 h	SKBR-3 24 h	SKBR-3 24 h–24 h	SKBR-3 48 h
Ptx	7.82 ± 0.18	3.88 ± 0.74	2.24 ± 0.33	7.31 ± 1.54	0.30 ± 0.03†	0.49 ± 0.13†
PAMAM-ptx-trastuzumab	0.585 ± 0.18*	0.05 ± 0.01*	0.09 ± 0.01*	0.72 ± 0.21*	0.005 ± 0.004*†	0.002 ± 0.001*†
Doc	23.76 ± 4.81	21.47 ± 14.42	9.19 ± 3.36	10.75 ± 1.50†	2.85 ± 0.04	2.00 ± 0.44
PAMAM-doc-trastuzumab	>100*	>100*	48.85 ± 4.82*	2.03 ± 0.07*†	0.012 ± 0.005*†	0.004 ± 0.002*†

The IC_{50} values are presented as the mean ± standard deviation of three experiments. *: statistically significant difference towards free drug at ($p < 0.05$); †: statistically significant difference between cell lines ($p < 0.05$)

Bold font - remarkable selectivity of PAMAM-doc-trastuzumab conjugate for both breast cancer cell lines

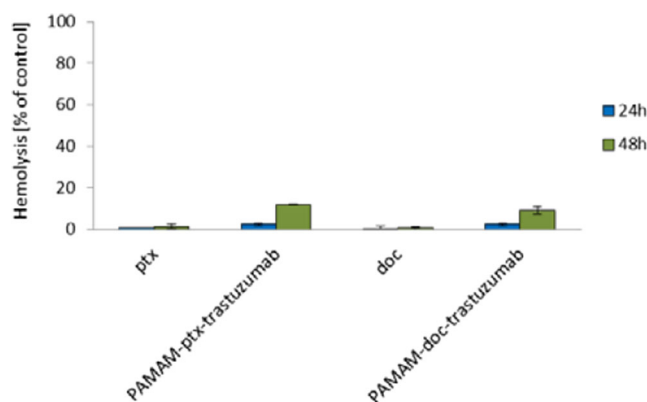


Fig. 10 Hemotoxicity of paclitaxel, docetaxel, PAMAM-ptx-trastuzumab and PAMAM-doc-trastuzumab conjugates. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments

concentrations of $0.1 \mu\text{M}$ for up to 48 h. As expected, the HER-2-positive SKBR-3 cell line accumulated trastuzumab from both conjugates rapidly; but surprisingly, although a large amount of PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate was observed in the HER-2-negative MCF-7 cells (Fig. 11). It is likely that the linker-bonded conjugate was less stable in the more acidic environment of the cancer cells, which resulted in

earlier paclitaxel release. Importantly, the cellular uptakes of free paclitaxel and docetaxel, even after 48 h of incubation, were significantly lower than the PAMAM-drug-trastuzumab conjugates. This is in good agreement with our results obtained by MTT assay, as well as those of previous studies; for example, Miyano *et al.* suggested that trastuzumab conjugated to the KG6E dendrimer shows HER-2-specific binding, and a consequent high rate of cellular internalisation (9). Other reports have demonstrated the rapid internalisation of trastuzumab-PAMAM (26) and trastuzumab-PLGA (27) nanoparticle conjugates into HER-2-positive breast cancer cells in comparison with free trastuzumab.

Confocal microscopy was used to confirm the intracellular localisation of free paclitaxel, docetaxel and the PAMAM-ptx-trastuzumab and PAMAM-doc-trastuzumab conjugates. Incubation of HER-2 positive SKBR-3 and HER-2 negative MCF-7 cells with $0.1 \mu\text{M}$ of the FITC modified compounds was carried out for 24 h (Fig. 12). Both free drugs were internally localised in both cell lines to some extent; however, paclitaxel was found to be accumulated in the nucleus region in contrast to docetaxel, which was located in the cytosol. Although both conjugates were more concentrated in the nucleus of HER-2-positive compared with negative cells,

Fig. 11 Cellular uptake of free paclitaxel and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate (upper panel) and free docetaxel and PAMAM-doc-trastuzumab conjugate (lower panel) at a concentration of $0.1 \mu\text{M}$ by MCF-7 and SKBR-3 cells after incubation for 1, 2, 3, 4, 5, 24, and 48 h

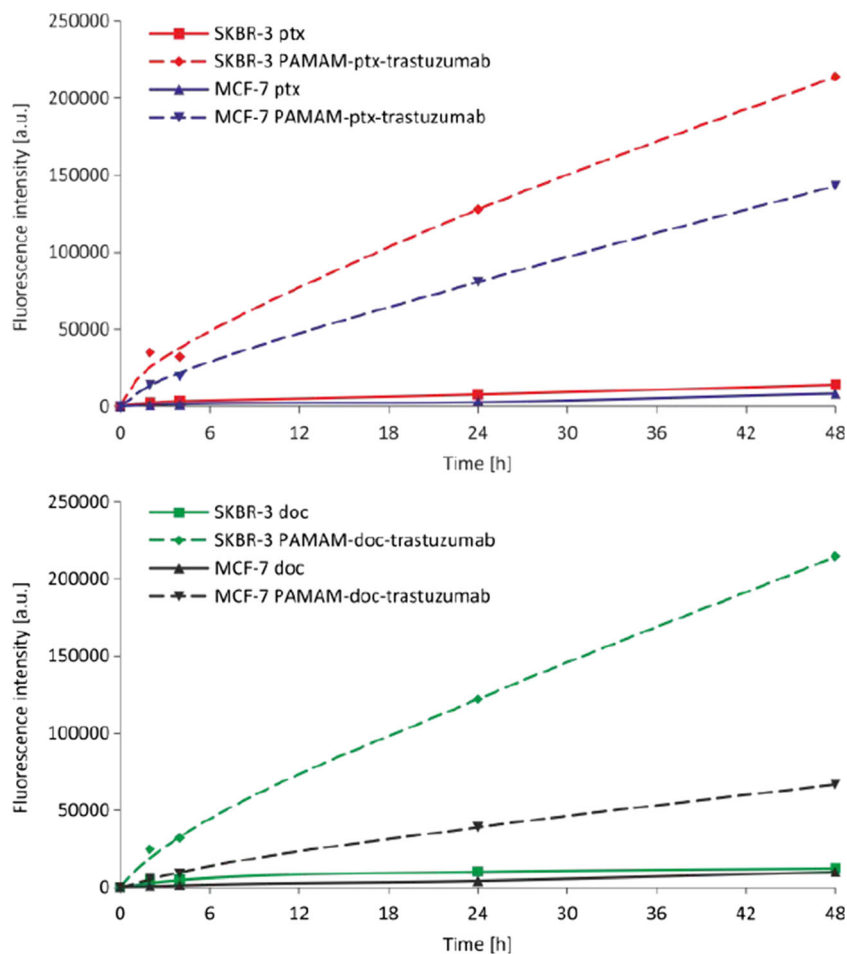
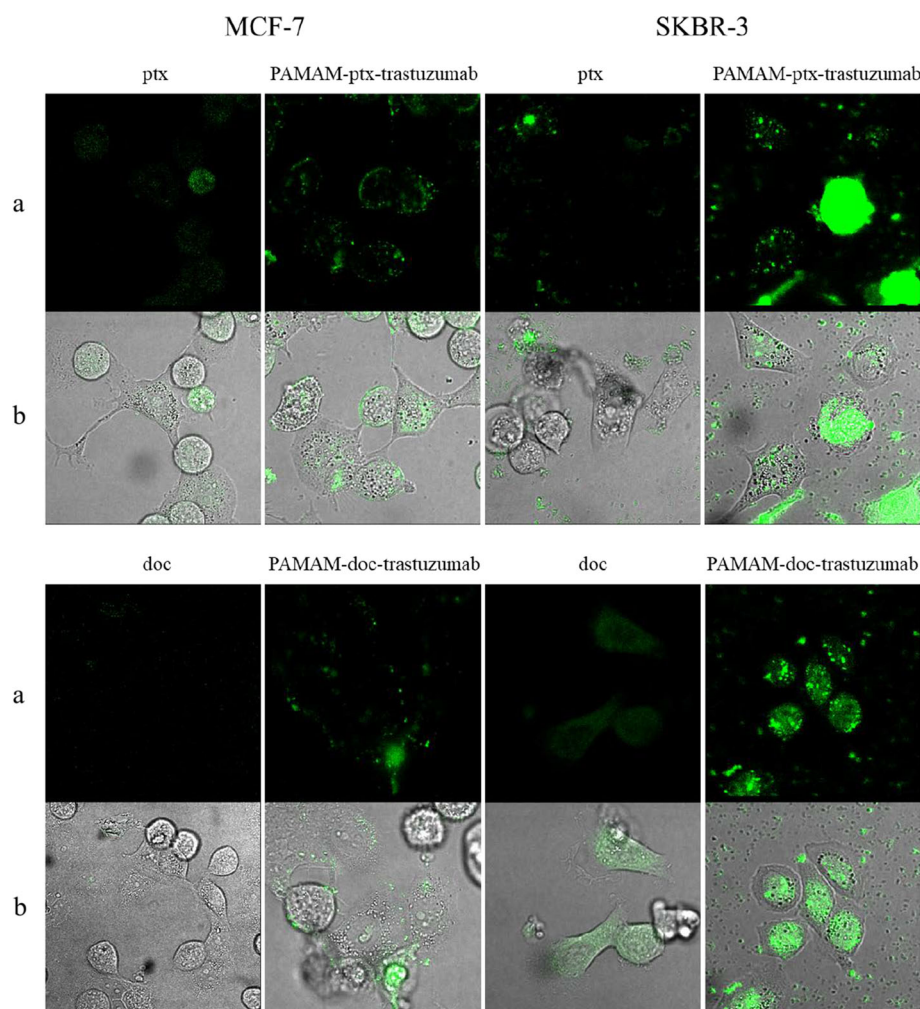


Fig. 12 Confocal images of MCF-7 and SKBR-3 cells treated with 0.1 μ M free paclitaxel and PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate (upper panel) and 0.1 μ M free docetaxel and PAMAM-doc-trastuzumab conjugate (lower panel) for 24 h. Paclitaxel, docetaxel and conjugates accumulation imaged using (a) the green channel, and (b) merged with transmitted light



accumulation of the PAMAM-ptx-trastuzumab conjugate was observed in HER-2-negative cells (mainly in the lysosomes). The key result of fluorescent imaging was the identification of strong selective binding of the PAMAM-doc-trastuzumab conjugate with HER-2-positive SKBR-3 cells only. To the best of our knowledge, this is the first reported example of the visualisation of PAMAM-ptx-trastuzumab and PAMAM-doc-trastuzumab conjugate localisation within HER-2-negative and positive cells.

Our results have a number of similarities with the findings of Ma *et al.* (20). In their study, trastuzumab was covalently linked to a PAMAM dendrimer via a bifunctional PEG linker, and was internalised more efficiently by HER-2-positive BT474 cells than by HER-2-negative MCF-7 cells. Moreover, co-localisation experiments indicated that the trastuzumab-PAMAM conjugate was located in the cytoplasm (20). In other studies, trastuzumab conjugated with the KG6E dendrimer bound selectively to SKBR-3 cells, rather than to MCF-7 cells, although the conjugate was internalised to the lysosomes (9). Rodalleg *et al.* confirmed the cellular uptake of docetaxel-trastuzumab stealth immunoliposomes (ANC-1) in different HER-2-positive cell lines, and found that ANC-1 was primarily

localised around the cell nuclei. However, ANC-1 showed increased accumulation in SKBR-3 cells compared with the MDA-MB-453 or MDA-MB-231 cell lines (22).

Covalent attachment of a humanised monoclonal antibody trastuzumab to a G5 PAMAM dendrimer containing the drug methotrexate (to form the G5-Fl-HN-MTX conjugate) has been used in the treatment of skin, lung and breast cancer (18). Co-localisation experiments carried out in HER2-expressing MCA207 cell line have indicated that G5-Fl-HN-MTX was localised in the late endosomes and lysosomes within 1 h of exposure, but the most surprising result was the long residence time (48 h) of the conjugate in the lysosomes. This may result in the reduced cytotoxicity which is observed in the case of the G5-Fl-HN-MTX conjugate. Our conjugates are free of such a disadvantage, as it is demonstrated by the results of the MTT assay. Although the steric hindrance caused by covalent conjugation of the antibody to the G5 PAMAM dendrimer may prevent intracellular esterase enzymes from releasing the drug, the conjugate is unable to affect its cytotoxic activities because of the extended retention in the lysosomes. It was for this reason that we decided to use a pH-dependent linker that allows the conjugate to disintegrate in the acidic environment of the cancer cell.

In the literature there are many examples of improved drug delivery as a promising strategy to optimise the effectiveness of anticancer drugs while reducing the toxicity associated with treatment. This study is the first step towards enhancing our knowledge about the design of selective conjugates which can be successfully used for targeted therapy.

CONCLUSION

Preclinical studies have demonstrated that HER-2 overexpression occurs in over 20% of breast carcinomas and is associated with resistance to anticancer drugs such as paclitaxel and docetaxel (28). Such studies have also reported the additive effects of synergistic interactions between trastuzumab and taxanes (29). The present study presents the successful synthesis and characterisation of the HER-2-targeted conjugates PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab. Analysis of the cytotoxicity, cellular uptake and internalisation of the conjugates indicate that they represent promising carriers for HER-2-expressing tumour-selective delivery. The observed selectivity is achieved not only through the inclusion of trastuzumab, which binds and blocks HER-2, but also through the selection of a pH-sensitive linker that breaks in the tumour environment to allow PAMAM-drug conjugate release. Both conjugates show potential as drug delivery systems enhancing the therapeutic index and reducing the required dosage of anticancer drugs. In our opinion these conjugates might be superior for *in vivo* application due to their increased toxicity for HER-2-positive breast cancer due to specific targeting to tumor cells.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

This work was sponsored by the National Science Centre (Project: “Nanoparticle conjugates with the monoclonal antibody – a new opening in target tumor therapy” UMO-2015/19/N/NZ3/02942).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

REFERENCES

1. Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* 2006;24(1):39–47.
2. Hurrell T, Outhoff K. The *in vitro* influences of epidermal growthfactor and heregulin- β 1 on the efficacy of trastuzumab used in Her-2positive breast adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* 2013;13:97.
3. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol.* 2005;23:4265–74.
4. National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Breast Cancer Guidelines.
5. Datko F, D'Andrea G, Dickler M, Theodoulou M, Goldfarb S, Lake D, et al. Abstract P5-18-20: phase II study of pertuzumab, trastuzumab, and weekly paclitaxel in patients with metastatic HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(24 Suppl):18–20.
6. Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today.* 2001;6:427–36.
7. Teow HM, Zhou Z, Najlah M, Yusof SR, Abbott NJ, D'Emanuele A. Delivery of paclitaxel across cellular barriers using a dendrimer-based nanocarrier. *Int J Pharm.* 2013;441(1–2):701–11.
8. Khandare JJ, Jayant S, Singh A, Chandna P, Wang Y, Vorsa N, et al. Dendrimer versus linear conjugate: influence of polymeric architecture on the delivery and anticancer effect of paclitaxel. *Bioconjug Chem.* 2006;17(6):1464–72.
9. Miyano T, Wijagkanalan W, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Anionic amino acid dendrimer-trastuzumab conjugates for specific internalization in HER2-positive cancer cells. *Mol Pharm.* 2010;7:1318–27.
10. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198(2–3):165–84.
11. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:347–60.
12. Khandare J, Kolhe P, Pillai O, Kannan S, Lich-Lai M, Kannan RM. Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates. *Bioconjug Chem.* 2000;16(2):330–7.
13. Garea SA, Ghebaur A. FT-IR spectroscopy and thermogravimetric characterization of prodrugs based on different dendritic polymers and antitumoral drug. *Materiale Plastice.* 2012;49:1–4.
14. Marcinkowska M, Sobierajska E, Stanczyk M, Janaszewska A, Chworos A, Klajnert-Maculewicz B. Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy. *Polymers* 2018; 10 (2), art. no. 187.
15. Ciolkowski M, Petersen JF, Ficker M, Janaszewska A, Christensen JB, Klajnert B, et al. Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility. *Nanomedicine.* 2012;8(6):815–7.
16. Yabbarov NG, Posypanova GA, Vorontsov EA, Popova ON, Severin ES. Targeted delivery of docetaxel/paclitaxel: drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry.* 2013;78: 884–94.
17. Zhu S, Hong M, Zhang L, Tang G, Jiang Y, Pei Y. PEGylated PAMAM dendrimer-docetaxel/paclitaxel conjugates: *in vitro* evaluation and *in vivo* tumor accumulation. *Pharm Res.* 2010;27:161–74.
18. Shukla R, Thomas TP, Desai AM, Kotlyar A, Park SJ, Baker JR. HER2 specific delivery of methotrexate by dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Nanotechnology.* 2008;19:295102.

19. Kulhari H, Pooja D, Shrivastava S, Kuncha M, Naidu VGM, Bansal V, et al. Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6:23179.
20. Ma P, Zhang X, Ni L, Li J, Zhang F, Wang Z, et al. Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2173–90.
21. Gurdag S, Khandare J, Stapels S, Matherly LH, Kannan RM. Activity of dendrimer-methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines. *Bioconjug Chem*. 2006;17:275–83.
22. Rodallec A, Brunel JM, Giacometti S, Maccario H, Correard F, Mas E, et al. Docetaxel-trastuzumab stealth immunoliposome: development and in vitro proof of concept studies in breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3451–65.
23. Okuda T, Kawakami S, Maeie T, Niidome T, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration. *J Control Release*. 2006;114:69–77.
24. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, et al. Interactions of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayer and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjug Chem*. 2004;15:774–82.
25. Klajnert B, Pikala S, Bryszewska M. Haemolytic activity of polyamidoamine dendrimers and the protective role of human serum albumin. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2010;466(2117):1527–34.
26. Shukla R, Thomas TP, Peters JL, Desai AM, Kukowska-Latallo J, Patri AK, et al. HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Bioconjug Chem*. 2006;17:1109–15.
27. Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 2008;3:145–50.
28. Ciardello F, Caputo R, Pomato G, De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR, et al. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment by antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase a. *Int J Cancer*. 2000;85:710–5.
29. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344:783–92.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy

Monika Marcinkowska¹, Maciej Stanczyk², Anna Janaszewska¹, Ewelina Sobierajska¹, Arkadiusz Chworos³ and Barbara Klajnert-Maculewicz^{1,4,*}

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

² Department of Surgical Oncology, Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland

³ Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-236 Lodz, Poland

⁴ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany

* Correspondence: barbara.klajnert@biol.uni.lodz.pl

FTIR analysis

FTIR Spectroscopy is considered a suitable techniques for studying the interactions of drug with polymers. In the our studies we used FTIR spectroscopy to characterize the conjugates based on paclitaxel, docetaxel and PAMAM G4 dendrimers. FTIR spectra were collected using the Nicolet 6700 Series FTIR apparatus equipped with Omnic Program, at resolution of 2cm⁻¹.

The FTIR spectrum of PAMAM-ptx is shown in Figure S1. The main peaks are as follows: N-H and OH stretching vibrations at 3424-3248 cm⁻¹, methylene asymmetric and symmetric stretching vibrations at 2916-2869 cm⁻¹. The signal connected witch C=O stretching vibration from the ester groups is situated at 1737 cm⁻¹. The signal for amide bound is located at 1650 cm⁻¹, N-H bending of N-substituted amide at 1439 cm⁻¹ and C-C bending at 1355cm⁻¹. Ester bond stretching vibrations and C-N stretching vibrations are situated at 1244 cm⁻¹ and 1295 cm⁻¹ respectively. The aromatic bonds are observed at 1019, 906 and 705 cm⁻¹. The presence of new peaks at 951 and 705 cm⁻¹ in the FTIR spectra of conjugate show the PAMAM-drug interactions. The peak at 951 cm⁻¹ appears at higher frequency than in paclitaxel spectrum and this fact suggests the presence of interactions between the paclitaxel and dendrimers.

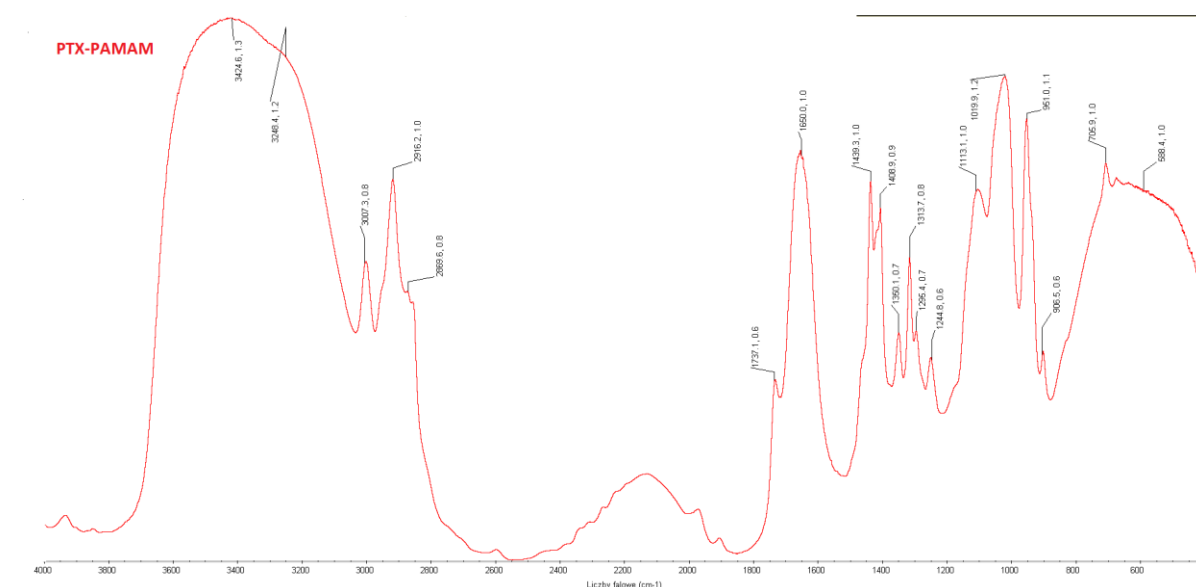


Figure S1. The FTIR spectrum of PAMAM-ptx.

The FTIR spectrum of PAMAM-doc is shown in Figure S2. The main peaks are as follows: N-H and OH stretching vibrations at 3422cm^{-1} , methylene asymmetric and symmetric stretching vibrations around 2920cm^{-1} . The amide bond is located at 1647 cm^{-1} , N-H bending of N-substituted amide at 1439 cm^{-1} and C-C bending at 1350 cm^{-1} . Ester bond stretching vibrations and C-N stretching vibrations are situated at 1248 cm^{-1} . A band corresponding to C-O bond is at 1109 cm^{-1} . The aromatic bonds are observed at 1019 and 712 cm^{-1} . The presence of new signals at 951 and 712 cm^{-1} in the FTIR spectra of conjugate are suggested about the PAMAM-drug interactions.

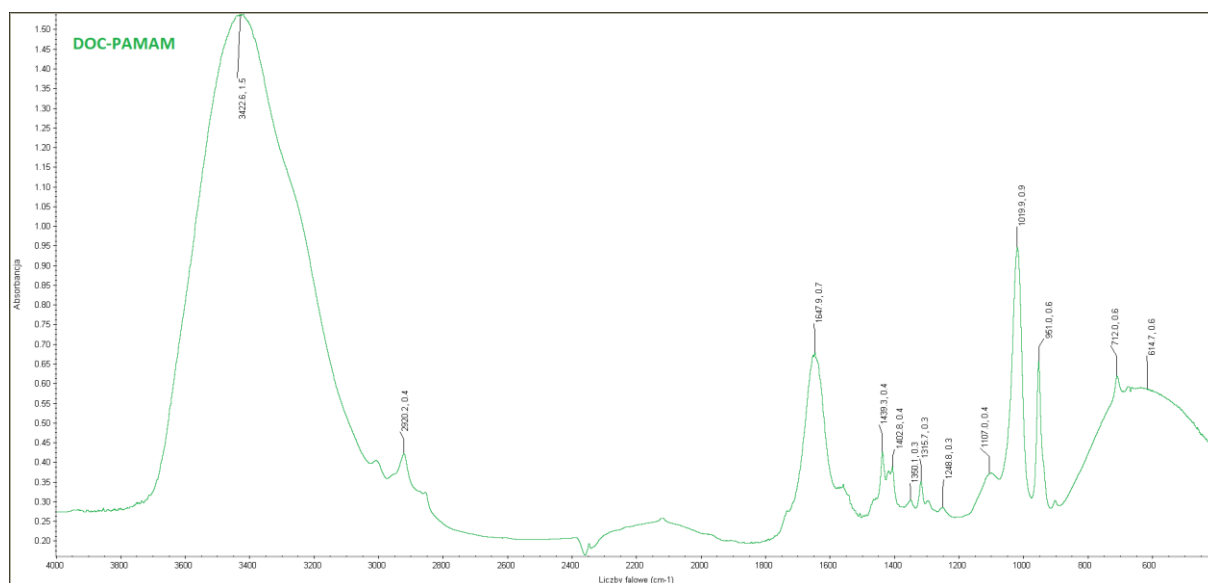


Figure S2. The FTIR spectrum of PAMAM-doc.

The other peaks detected in the FTIR spectra of PAMAM-ptx and PAMAM-doc conjugates were assigned to the characteristic bonds presented in PAMAM molecules. Assignments of these peaks are summarized in Table S1.

Table S1. FTIR analysis for PAMAM-ptx and PAMAM-doc conjugates.

Spectral assignments	PAMAM-ptx (cm ⁻¹)	PAMAM-doc (cm ⁻¹)
NH stretching vibrations	3424, 3248	3422
CH stretching vibrations	2916, 2869	2920
Amide I mode vibrations	1737	1647
Amide II mode vibrations	1650	1650
CH scissoring vibrations	1439	1439
CH twisting vibrations	1313	1315

DLS analysis

Additionally, the hydrodynamic diameter (r_h) of both conjugates was obtained by DLS experiments. Dynamic light scattering (DLS) measurements have been obtained using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) at $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, equipped with a 600 μL quartz batch cuvette (Hellma, Germany). The concentration of the samples was adjusted to 10 μM , to avoid the effect of particle-particle interactions on the diffusion coefficient. Results received previously for trastuzumab were included for comparison purposes (Table S2).

Table S2. The experimental results of PAMAM-doc-trastuzumab and PAMAM-ptx-trastuzumab hydrodynamic diameter. The r_h values are presented as the mean $\pm$ standard deviation of six experiments.

sample	r_h [nm]
trastuzumab [s1]	5.20 ± 0.10
trastuzumab [s2]	5.15 ± 0.08
trastuzumab [s3]	5.30 ± 0.10
PAMAM-doc-trastuzumab	14.83 ± 1.60
PAMAM-ptx-trastuzumab	12.09 ± 0.61

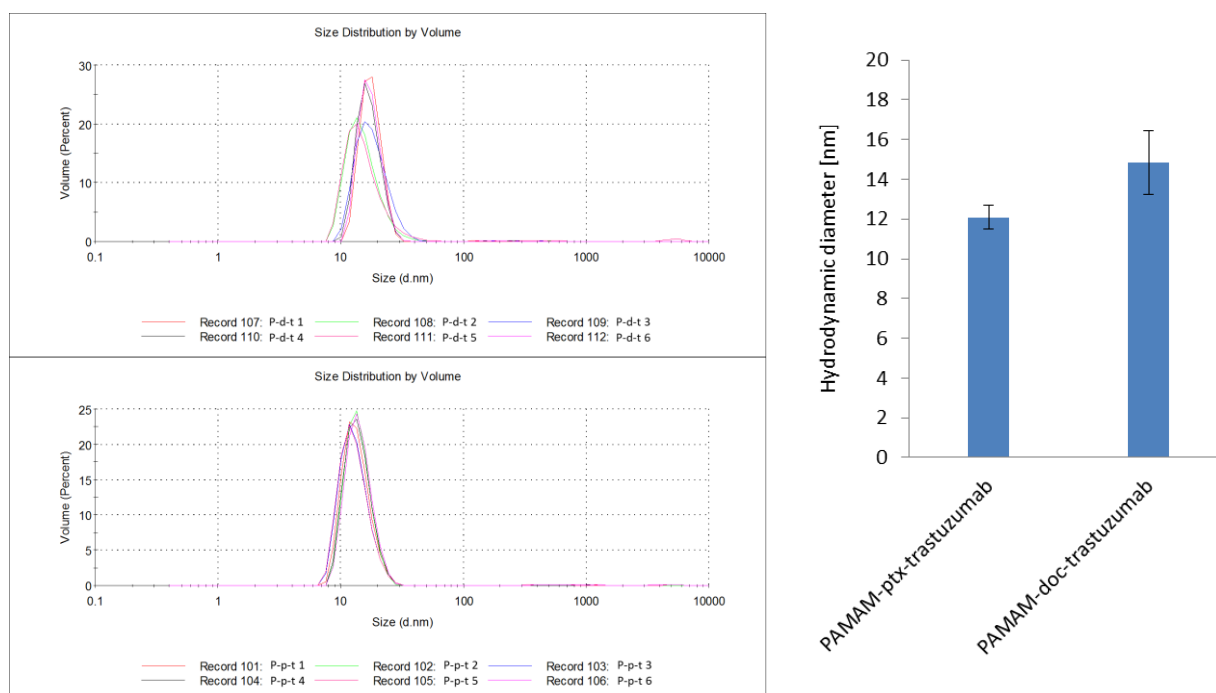


Figure S3. The DLS spectra of PAMAM-doc-trastuzumab (upper) and PAMAM-ptx-trastuzumab (lower).

Literature

- [s1] Brandt JP, Patapoff TW, Aragon SR. Construction, md simulation, and hydrodynamic validation of an all-atom model of a monoclonal igg antibody. *Biophys. J.*, 99 (2010), 905-913
- [s2] Scheer JM, Sandoval W, Elliott JM, Shao L, Luis E, Lewin-Koh SC, Schaefer G, Vandlen R. Reorienting the Fab domains of trastuzumab results in potent HER2 activators. *PLoS One*. 2012;7(12):e51817
- [s3] Espinosa-de la Garza CE, Miranda-Hernández MP, Acosta-Flores L, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, Medina-Rivero E. Analysis of therapeutic proteins and peptides using multiangle light scattering coupled to ultra high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2015 May;38(9):1537-43.

28.08.2019

mgr Monika Marcinkowska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, syntezie i charakterystyce badanych związków, wykonaniu zdjęć konfokalnych, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 45%.

Monika Marcinkowska

28.08.2019

dr n. med. Maciej Stańczyk

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika

ul. Pabianicka 62

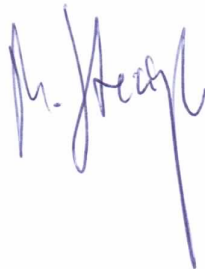
93-513 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 35%.



28.08.2019

dr hab. Anna Janaszewska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

t. p. p.

28.08.2019

mgr Ewelina Sobierajska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na wykonaniu oznaczeń żywotności komórek, oznaczeń szybkości wnikania związków do komórek i analizie danych.

Mój wkład oceniam na 5%.

Sobierajska Ewelina

28.08.2019

dr hab. Arkadiusz Chworos

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

ul. H. Sienkiewicza 112

90-363 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na wykonaniu oznaczeń HPLC, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

Chworos Arkadiusz

28.08.2019

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Eweliny Sobierajskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

B. Klajnert-Maculewicz

Article

Conjugate of PAMAM Dendrimer, Doxorubicin and Monoclonal Antibody—Trastuzumab: The New Approach of a Well-Known Strategy

Monika Marcinkowska ¹, Ewelina Sobierajska ¹, Maciej Stanczyk ², Anna Janaszewska ¹, Arkadiusz Chworos ³  and Barbara Klajnert-Maculewicz ^{1,4,*} 

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; monika.marcinkowska@biol.uni.lodz.pl (M.M.); ewelina-s93@wp.pl (E.S.); ankuj@poczta.onet.pl (A.J.)

² Department of Surgical Oncology, Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital, 93-509 Lodz, Poland; macstanczyk@gmail.com

³ Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-236 Lodz, Poland; achworos@cbmm.lodz.pl

⁴ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany

* Correspondence: barbara.klajnert@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-6354-429

Received: 18 January 2018; Accepted: 12 February 2018; Published: 14 February 2018

Abstract: The strategy utilizing trastuzumab, a humanized monoclonal antibody against human epidermal growth receptor 2 (HER-2), as a therapeutic agent in HER-2 positive breast cancer therapy seems to have advantage over traditional chemotherapy, especially when given in combination with anticancer drugs. However, the effectiveness of single antibody or antibody conjugated with chemotherapeutics is still far from ideal. Antibody–dendrimer conjugates hold the potential to improve the targeting and release of active substance at the tumor site. In the present study, we developed and synthesized PAMAM dendrimer–trastuzumab conjugates carrying doxorubicin (dox) specifically to cells overexpressing HER-2. ¹HNMR, FTIR and RP-HPLC were used to characterize the products and analyze their purity. Toxicity of PAMAM–trastuzumab and PAMAM–dox–trastuzumab conjugates compared with free trastuzumab and doxorubicin towards HER-2 positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines was determined using MTT assay. Furthermore, the cellular uptake and cellular localization were studied by flow cytometry and confocal microscopy, respectively. A cytotoxicity profile of above mentioned compounds indicated that conjugate PAMAM–dox–trastuzumab was more effective when compared to free drug or the conjugate PAMAM–trastuzumab. Moreover, these results reveal that trastuzumab can be used as a targeting agent in PAMAM–dox–trastuzumab conjugate. Therefore PAMAM–dox–trastuzumab conjugate might be an interesting proposition which could lead to improvements in the effectiveness of drug delivery systems for tumors that overexpress HER-2.

Keywords: PAMAM dendrimer; trastuzumab; HER-2; doxorubicin; tumor targeting

1. Introduction

According to World Health Organization (WHO) reports, breast cancer is the most common tumor among every major ethnic group of women, with almost 1.7 million new cases diagnosed in 2012 [1]. Chemotherapy is the most frequent strategy used in the battle against malignant tumors, however, it is not trouble-free. There are many reasons leading to failure of this treatment, although the inability of anticancer agents to selectively target tumor cells remains the most considerable impediment to successful chemotherapy. Thus, tumor-targeted drug delivery is one of the most

thoroughly investigated research areas in terms of cancer and it is believed to be a solution to the chemotherapy limitations, including low drug efficacy and high systemic side effects [2].

Monoclonal antibody-based cancer treatment has been developed as one of the successful therapeutic and selective strategies [3]. The prime example of a monoclonal antibody used in this approach is humanized anti-HER2 mAb trastuzumab (Herceptin) that plays a major role in breast cancer treatment because human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu/ErbB) gene amplification or protein overexpression occurs in 20% to 25% of breast tumors. It makes it a potential candidate for targeted antibody therapy since trastuzumab blocks the HER-2 by binding to domain IV of an out-of-cell part of this protein, whereby inhibiting the excessive proliferation of tumor cells. The antibody is frequently administered together with cytotoxic agents (i.e., taxanes or anthracyclines) to increase the therapeutic efficacy [4,5]. However, the systemic toxicity of the anticancer drugs and/or decrease in the receptor recognition are still a serious problem [6].

New solutions are sought in terms of selective delivery of therapeutic agents. Plenty of nanoparticles such as hyperbranched polymers, liposomes, micelles or dendrimers are believed to be good candidates to play this role [7]. Among them, PAMAM dendrimers attract considerable interest. Numerous attractive features of PAMAM dendrimers such as monodispersity, nano-size and globular shape, high solubility and reactivity, biocompatibility, availability of multiple functional groups at the periphery, easy chemical modification and cavities in the interior distinguish them as unique carriers. Thus, they are an extensively studied group of nanoparticles [8–13]. Formation of stable covalent links between the surface groups of the dendrimer and a drug allows to protect the active substance in the circulatory system and transport it, through the enhanced permeability and retention effect (EPR), to the tumor environment, where, thanks to low pH, hydrolysis of covalent bonds occurs and the drug can be released. It gives a chance to reduce a dose while maintaining the same therapeutic effect. However, we decided to use PAMAM dendrimer not only as a carrier of an anticancer drug but also as a connecting link between the monoclonal antibody trastuzumab and antitumor agents. The presence of trastuzumab on the surface of the dendrimer–drug conjugate might enhance transport of the active substance directly to cells overexpressing HER-2 [14–16].

To verify whether the increase in conjugate selectivity for the specific type of cancer can be achieved, we synthesized a conjugate, in which we combined a protective effect of PAMAM G4 dendrimer, cytotoxic properties of doxorubicin [17] and targeted activity of trastuzumab. Our research model consisted of HER-2 positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines. We performed a toxicity evaluation of PAMAM–trastuzumab and PAMAM–dox–trastuzumab conjugates compared with free trastuzumab and doxorubicin. Subsequently, we checked the rate of uptake into the cells and cellular localization of the studied compounds. Our results obtained for the conjugate PAMAM–dox–trastuzumab showed an increase in the toxic efficiency towards HER-2 positive human breast cancer cells compared to the free drug or the conjugate PAMAM–trastuzumab. To our knowledge, the proposed approach is novel and we hope that it can lead to improvements in the effectiveness of the therapy of the most common women's cancer.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All chemical reagents were purchased from commercial suppliers. Solvents for the synthesis were purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). All cell culture reagents were purchased from Gibco® (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warsaw, Poland). Flasks and multiwell plates for in vitro studies were obtained from Nunc (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warsaw, Poland). Amine terminated PAMAM G4 dendrimer, doxorubicin hydrochloride, PBS (phosphate buffered saline), FBS (fetal bovine serum) and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma-Aldrich. Trypan blue was purchased from Molecular Probes (Thermo Scientific™, Warsaw, Poland). Herceptin (trastuzumab) was a gift from Roche Poland. Human breast adenocarcinoma's cell

lines: HER-2 negative (MCF-7 ATCC no. HTB-22) and HER-2 positive (SKBR-3 ATCC no. HTB-30) were purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z o. o., Lomianki, Poland).

2.2. Synthesis of PAMAM Doxorubicin Conjugate

Shortly, dox was dissolved in 3 mL of 0.1 M PBS at 25 °C. *cis*-Aconitic anhydride (CAA) was dissolved in 500 µL of *p*-dioxane and slowly added to the dox solution while maintaining the reaction mixture pH at 8.5. The solution was incubated with stirring for 20 min, and then for 20 min at 25 °C, in dark. Then, the reaction mixture was cooled on ice, supplemented with 100 mM HCl until pH reached 3.0 and extracted by ethyl acetate. To the resulting dox–CAA in PBS (pH 6) was added 5-fold molar excess of *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), and the mixture was stirred at 20 °C for 0.5 h, in dark. PAMAM G4 was dissolved in 1 mL of PBS, pH 6.0, dox–CAA was added. The mixture was incubated with intensive stirring at 25 °C, pH 7.8, for 12 h. The PAMAM G4–dox was purified by ultrafiltration on an Amicon Ultra-3K (molecular weight cut-off, MWCO = 3 kDa, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). ¹HNMR and FTIR was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM and doxorubicin conjugation. ¹HNMR spectra were recorded on Bruker Avance III DRX-600 and 500 MHz spectrometers (Poznan, Poland), using deuterated D₂O as solvents. The FTIR spectra were collected with a FTIR ATI Mattson Spectrometer Spectrum (Middleton, MA, USA) and samples were measured as thin film in KBr crystals. The analytical data can be found in the Supplementary Materials.

2.3. Synthesis of PAMAM–dox–trastuzumab Conjugate

The synthesis of PAMAM doxorubicin trastuzumab conjugate was performed using a method invented by us (patent pending P.421439).

Activation of trastuzumab: SMCC was dissolved in a small volume of DMF, and diluted by adding 0.1 M PBS (phosphate buffered saline) pH 7.6, which contains 5 mM EDTA to obtain 1 mg/mL. The solution was added to trastuzumab. The mixture was incubated for 1 h at room temperature (RT). In the next steps crude mixture was purified and buffer-exchanged into PBS pH 7.0, with Amicon Ultra-30 K column (MWCO = 30 kDa).

Introduction of thiol groups for the PAMAM G4 dendrimer surface: Traut's reagent converts primary amine into thiol in the range of pH 7–10, however its half-life in solution decreases as the pH increases. Modification with Traut's reagent (2-iminothiolane) is very efficient and occurs rapidly at slightly basic pH. To introduce thiol groups into G4 dendrimer surface, the primary amine groups were reacted with a 10:1 mole excess of Traut's reagent in 0.1 M PBS buffer, at room temperature under N₂ for 1 h pH 8.0. Thiolated PAMAM G4 was purified and buffer exchanged into PBS, pH 7.0 by ultrafiltration on an Amicon Ultra-3 K column.

The reaction of the modified PAMAM G4 dendrimer with the activated trastuzumab: Derivatized trastuzumab was reacted with thiolated PAMAM G4 dendrimer at a 1:12 molar ratio. The reaction was conducted in PBS, pH 7.0 at 25 °C for 24 h. Finally, PAMAM–trastuzumab conjugate was purified from excess thiolated PAMAM G4 by Amicon Ultra-30 K (MWCO 30 kDa). The final stoichiometric ratio for PAMAM–dox–trastuzumab conjugate was 1:1:1.

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM and trastuzumab conjugation. Solvents used for HPLC analysis were at the HPLC grade; iPrOH, MeOH, MeCN was from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland), trifluoroacetic acid from J.T.Baker®(9470) and Milli-Q water. All experiments were performed on two FPLC/HPLC systems: (1) AKTA Purifier two pumps system equipped with UV-900 monitoring (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA), pH and conductivity probe and fraction collector Frac-920 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Analysis using AKTA was performed at room temperature 25 °C. (2) Shimadzu Prominence UFLC system equipped with LC-20AD isocratic pumps (Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, MD, USA) with RF-20A fluorescence detector (Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, MD, USA), SPD-M20A diode array

detector (Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, MD, USA) for UV–Vis monitoring and CTO-20ASvp column oven (Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, MD, USA) that was setup at 75 °C. Initially, SOURCE uRPC C2/C18 ST 4.6/100 column (Pharmacia Biotech, San Jose, CA, USA) was used, but it appeared to be too hydrophobic for dendrimer and antibody analysis, therefore for all presented results Jupiter 4u Proteo 90A 2.0/100 column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) was used. The analytical data can be found in the Supplementary Materials.

2.4. Cell Culture

HER-2 negative human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line was grown in DMEM medium supplemented with GlutaMAX and 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS). HER-2 positive human breast adenocarcinoma (SKBR3) cell line was grown in McCoy's 5 medium supplemented GlutaMAX and 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS). Cells were cultured in T-75 culture flasks in a humidified atmosphere containing 5.0% CO₂ at 37 °C and subcultured every 2 or 3 days. Cells were harvested and used in experiments after obtaining 80–90% confluence. The number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay with the use of Countess Automated Cell Counter (Invitrogen). Cells were seeded in flat bottom 96-well plates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 µL of an appropriate medium. After seeding, plates were incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5.0% CO₂ at 37 °C to allow cells to attach to the plates.

2.5. Determination of Cytotoxicity

The influence of the PAMAM dendrimer conjugates and pure doxorubicin on the cell viability was determined with the use of the MTT-assay. Briefly, to the 96-well plates containing cells at the density of 2.0×10^4 cells/well in medium different concentrations of all compounds were added. Cells were incubated with the dendrimer for 24 h in a 37 °C humidified atmosphere containing 5.0% CO₂. After the incubation period, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). Next, 50 µL of a 0.5 mg/mL solution of MTT in PBS was added to each well and cells were further incubated under normal culture conditions for 4 h. After incubation, the residue MTT solution was removed and the obtained formazan precipitate was dissolved in DMSO (100 µL/well). The conversion of the tetrazolium salt (MTT) to a colored formazan by mitochondrial and cytosolic dehydrogenases is a marker of cell viability. Before the absorbance measurement, plates were shaken for 1 min and the absorbance at 570 nm was measured on the PowerWave HT Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA).

2.6. Cellular Uptake Detection

In vitro uptake studies were carried out using fluorescent doxorubicin and PAMAM–dox–trastuzumab conjugate. The compounds were added at a concentration of 1 µM to the 12-well plates containing cells at the density of 1.5×10^4 cells/well (SKBR-3, MCF-7). Cells were incubated with the compounds for a specific time in a range from 1 h to 48 h in humidified atmosphere containing 5.0% CO₂ at 37 °C. After the appropriate incubation period, cells were washed with PBS, suspended in 500 µL of medium and immediately analyzed with a Becton Dickinson LSR II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using a blue laser (488 nm) and PE bandpass filter (575/26 nm).

2.7. Confocal Microscopy

Confocal microscopy images were obtained under 6300× magnification with Zeiss LSM 780 microscope equipped with 405 nm laser diode and InTune excitation laser system (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany). Cells at the density of 1×10^4 cells/well (SKBR-3) and 0.75×10^4 cells/well (MCF-7) were seeded on 96-well glass-bottom plates and incubated with 1 µM doxorubicin or PAMAM–dox–trastuzumab conjugate for 24 h in 37 °C humidified atmosphere containing 5.0% CO₂. After the incubation, cells were cooled on ice and washed once with cold phosphate buffered saline (PBS) to inhibit endocytosis. Cell nuclei were stained with DAPI in PBS for 10 min. Stained cells

were imaged to visualize fluorescence of doxorubicin in far-red channel (excitation 595 nm, emission 600–740 nm) and nuclei in blue channel (excitation 405 nm, emission 410–470 nm).

2.8. Statistical Analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Analysis of variance (ANOVA) with the Tukey post hoc test was used for results comparison. All statistics were calculated using the Statistica software (version 12, StatSoft, Tulsa, OK, USA, 2013), and p values < 0.05 were considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of PAMAM–trastuzumab and PAMAM–dox–trastuzumab Conjugates

The main drawback of most breast cancer treatments is high systemic toxicity, which leads to side effects. To overcome this nonspecific cytotoxicity, we synthesized a conjugate consisting of three components, each of them playing a different role: (1) trastuzumab provides specificity against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) that overexpresses in various cancer, including breast cancer; (2) doxorubicin provides cytotoxic effect; and (3) PAMAM dendrimer protects the whole conjugate in the circulatory system and, when linked with doxorubicin via pH-sensitive linker, provides drug release in tumor environment. Yabbarov et al. confirmed the dependence of release of doxorubicin on decreasing pH [18]. It has been observed that pH-dependent linkage is hydrolyzed and the drug is released in the environment of the tumor, which allows for the controlled administration of the active substance in the chosen site using the natural properties of tumor cells: fast metabolism and the acidic pH. We decided to combine doxorubicin and PAMAM dendrimer using *cis*-aconitic anhydride (CAA) [19]. Figure 1 presents the steps of PAMAM–dox–trastuzumab conjugate synthesis.

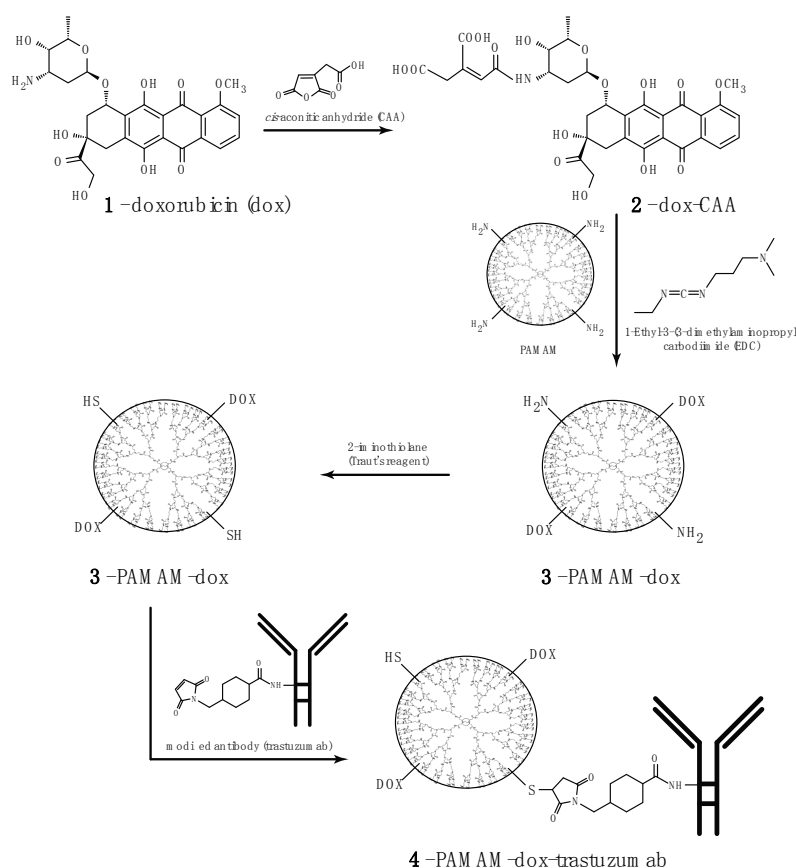


Figure 1. Synthesis of PAMAM–dox–trastuzumab conjugate.

The chemical structure of PAMAM–dox was characterized by ^1H NMR analysis and FTIR spectroscopy. The analytical data can be found in the Supplementary Materials.

In the next step, the PAMAM–dox conjugate was connected to the monoclonal antibody. To accomplish this, we used a succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) linker. The SMCC is a convenient crosslinking agent for the amino and thiol groups. The NHS esters react with primary amines to form stable amide bonds and maleimide part reacts with sulfhydryl groups to form stable thioethers. Therefore, to carry out this reaction, we had to modify amine PAMAM dendrimer groups into thiols. For this purpose, the Traut's reagent was used. Modification with Traut's reagent (2-iminothiolane) is very efficient and rapidly. It occurs at slightly basic pH [20].

To characterize the conjugates, we used FPLC/HPLC analysis. Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM and trastuzumab conjugation. The water/acetonitrile elution system was used initially, but better performance was achieved with following: A: 0.1% TFA in water; and B: 70% iPrOH, 20% MeCN, and 0.1% TFA in water. The typical gradient contained 0–80% B for 30 min 80–100% B in 5 min, 100% B for 10 min and 100–0% B in 5 min, as shown in Figure 2. Samples were typically injected as 20–100 μg of material suspended in 100 μL buffer A. As reported before, main absorption for PAMAM dendrimer is at 214 nm and this wavelength was used as well as 280 nm for the protein. However, we also monitored at 254 nm for a potential contamination. Additionally, Shimadzu diode array system provided us with UV profiles (200–600 nm was used). This allowed us to ascertain the purity of PAMAM dendrimer, absorbing at 220 nm as also reported before. The analytical data can be found in the Supplementary Materials.

In the second step, analysis of trastuzumab was carried out. Analysis was performed on UFLC system (two LC-20ADXP isocratic pumps, a CTO-20AS column oven with DIOD array UV–Vis monitoring) at 75 $^{\circ}\text{C}$. The elution system was as before: A: 0.1% TFA in water; B: 70% iPrOH, 20% MeCN, and 0.1% TFA in water. In the gradient 0–80% for 30 min, the main product (as monitored at 280 nm) appeared at 18.3 min. The UV profile of the main signal shows absorbance at 277 nm, as expected characteristic for proteins (Figure 2B).

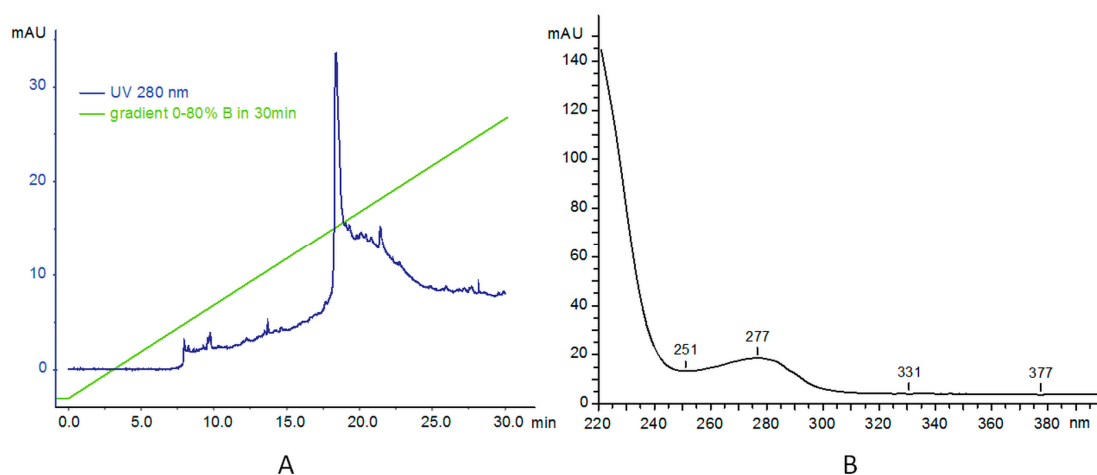


Figure 2. (A) RP-HPLC profile of trastuzumab; and (B) UV profile of the main signal at 18 min.

Finally, PAMAM–dox–trastuzumab conjugate was analyzed. Profile analysis showed an absorption at 280 nm. Analysis was carried out as before at 75 $^{\circ}\text{C}$, in: A: 0.1% TFA in water; and B: 70% iPrOH, 20% MeCN, and 0.1% TFA in water; and the gradient 0–80% for 30 min, injected 100 μg . The UV profile of the signal at 21 min shows three signals (Figure 3B). As expected, the absorbance signals at 276, 504 and 540 nm are characteristic for protein (the first) and doxorubicin (the last two signals).

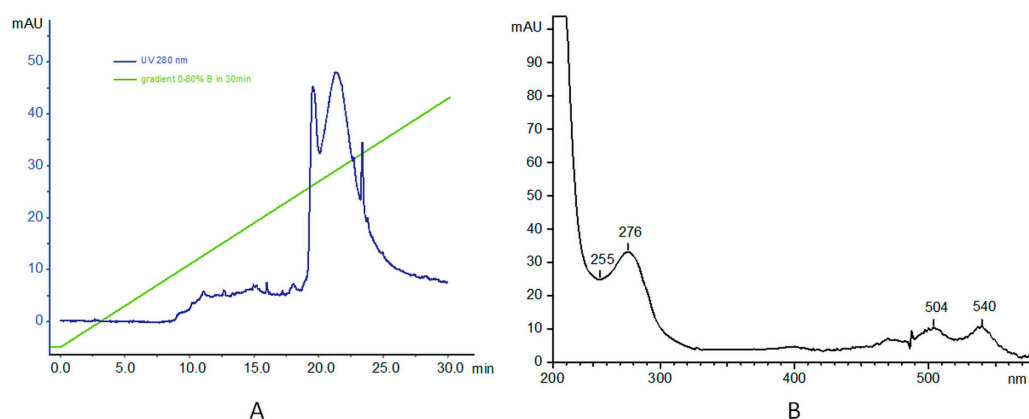


Figure 3. (A) RP-HPLC profile of PAMAM-dox-trastuzumab conjugate analysis; and (B) UV profile of the signal at 21 min.

3.2. In Vitro Studies

Two breast cancer cell lines (MCF-7 and SKBR-3) were used to study the anticancer activity of PAMAM-trastuzumab and PAMAM-dox-trastuzumab conjugates compared with free trastuzumab and doxorubicin. The cell lines were selected for their immunological profile. SKBR-3 cells are HER-2 positive while MCF-7 cells are HER-2 negative. Cytotoxicity was assessed using MTT assay to understand contribution of the above-mentioned compounds in targeting HER-2 positive breast cancer (Figure 4). The measurements were made after 24 and 48 h of incubation and additionally after 24 h incubation with the drug and 24 h incubation after removal of the drug (24–24 h). The addition of this incubation variant allows the assessment of cell damage and mortality after the drug is removed from the system.

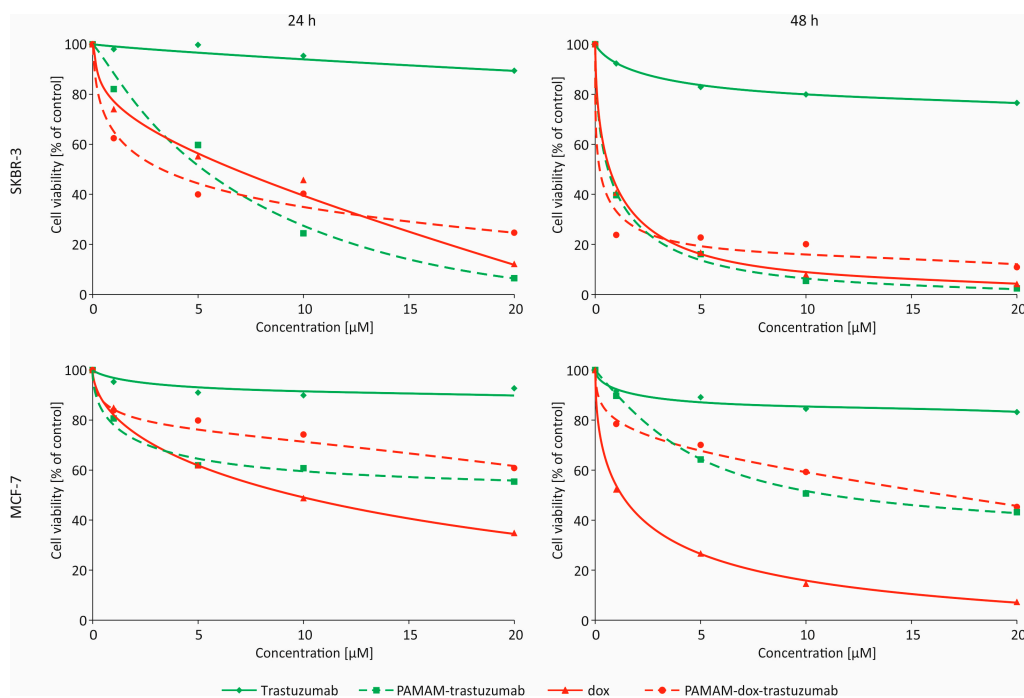


Figure 4. Influence of trastuzumab (green rhombus), doxorubicin (red triangles), PAMAM-trastuzumab (green squares) and PAMAM-dox-trastuzumab (red spheres) conjugates on the viability of MCF-7 and SKBR-3 cells assessed by MTT assay.

The cytotoxicity profile clearly indicates that free trastuzumab was inefficient in the tested concentration range but the conjugation of antibody with PAMAM dendrimer improved that cytotoxic effect. The observed effect was more pronounced for SKBR-3 cells than MCF-7 cells due to selective adhesion of the conjugate to cells overexpressing the HER-2. Moreover, the addition of doxorubicin, which is often administered in alternating cycles with trastuzumab, to PAMAM–trastuzumab conjugate enhanced the therapeutic effect and the selectivity, which was particularly noticed after 48 h of incubation. The IC₅₀ values (Table 1) for SKBR-3 cells demonstrated that PAMAM–dox–trastuzumab conjugate (0.003 ± 0.002 µmol/L) showed rise in selectivity and therapeutic effect when compared not only to PAMAM–trastuzumab conjugate (0.41 ± 0.06 µmol/L) but also to the free drug (0.342 ± 0.127 µmol/L). It indicates that there is a possibility of dose reduction while maintaining a therapeutic effect and selectivity, which can protect from cardiotoxicity caused by doxorubicin. Our results obtained for the conjugate PAMAM–dox–trastuzumab are unique because they show a synergistic effect and an increase in the toxic efficiency towards to HER-2 positive cells compared to the free drug or the conjugate PAMAM–trastuzumab and a decrease in the toxic efficiency towards to HER-2 negative cells. Recently, the effectiveness of dendrimer with conjugated monoclonal antibody and anticancer drug (docetaxel) has been also observed by Kulhari et al. [21]. These results demonstrate that trastuzumab can specifically target and deliver anticancer to HER2-positive cells.

Table 1. Comparison of IC₅₀ value for trastuzumab, doxorubicin, PAMAM–trastuzumab and PAMAM–dox–trastuzumab conjugates in two breast cancer cell lines. The IC₅₀ values are presented as mean $\pm$ S.D. of three experiments.

	MCF-7 24 h	MCF-7 24 h–24 h	MCF-7 48 h	SKBR-3 24 h	SKBR-3 24 h–24 h	SKBR-3 48 h
Trastuzumab	>100	>100	>100	>100	>100	>100
PAMAM–trastuzumab	32.46 ± 4.47 *	11.31 ± 4.06 *	11.92 ± 4.08 *	4.29 ± 0.06 *	2.81 ± 1.52 *	0.41 ± 0.06 *
Dox	9.20 ± 1.23	1.37 ± 1.61	1.10 ± 1.23	0.77 ± 0.16	0.19 ± 0.08	0.34 ± 0.13
PAMAM–dox–trastuzumab	38.40 ± 5.73	8.17 ± 4.85	14.86 ± 5.37	2.81 ± 0.74	0.14 ± 0.04	0.003 ± 0.002 *

* Statistically significant difference towards free drug at $p < 0.05$.

To analyze cellular uptake of doxorubicin and PAMAM–dox–trastuzumab conjugate by flow cytometry, cells were incubated with the compounds at concentration of 1 µM. Incubation times varied from 1 h to 48 h. The fluorescence could be observed because doxorubicin itself has an intrinsic fluorescence, which paradoxically makes it an imaging agent. All tested cell lines accumulated both compounds rapidly, although the largest amount was observed in SKBR-3 cells (Figure 5). In the case of MCF-7 cells, after 48 h incubation, the fluorescence intensity, which is directly proportional to the doxorubicin concentration, was considerably lower after treatment with PAMAM–dox–trastuzumab conjugate than with free doxorubicin. As expected, the effect was quite the opposite in terms of SKBR-3 cells, where uptake of PAMAM–dox–trastuzumab conjugate was higher than the free drug, which is in great agreement with our results obtained by MTT assay. This outcome corresponds to previous reports that PAMAM–methotrexate–trastuzumab specifically internalize in breast cancer cell line overexpressing HER-2 (MCA207-HER-2) [20]. This finding suggests that synthesis of HER-2-targeted dendrimer–drug conjugate can find applications in tumor-targeted drug delivery.

The increase in fluorescence intensity observed upon incubation of cells with the drug and conjugate may occur due to two processes: an uptake of the compounds within the cells or binding of them to the outer layer of cell membranes. To make certain that analyzed compounds actually localized in the cells, confocal microscopy was used as a visualization technique. Again, this method was based on the fluorescence of the doxorubicin. The concentration of the doxorubicin remained the same and equaled 1 µM. Confocal images are presented in Figure 6.

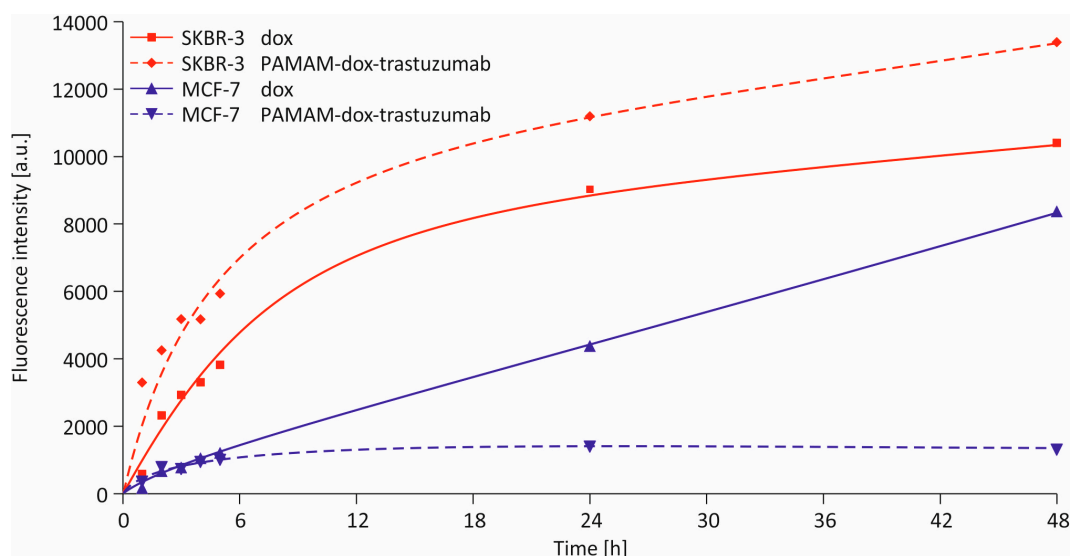


Figure 5. Cellular uptake of free doxorubicin and PAMAM–dox–trastuzumab conjugate at a concentration of 1 μ M by MCF-7 (blue triangles) and SKBR-3 (red rhombus/squares) cells after incubation for 1, 2, 3, 4, 5, 24, and 48 h.

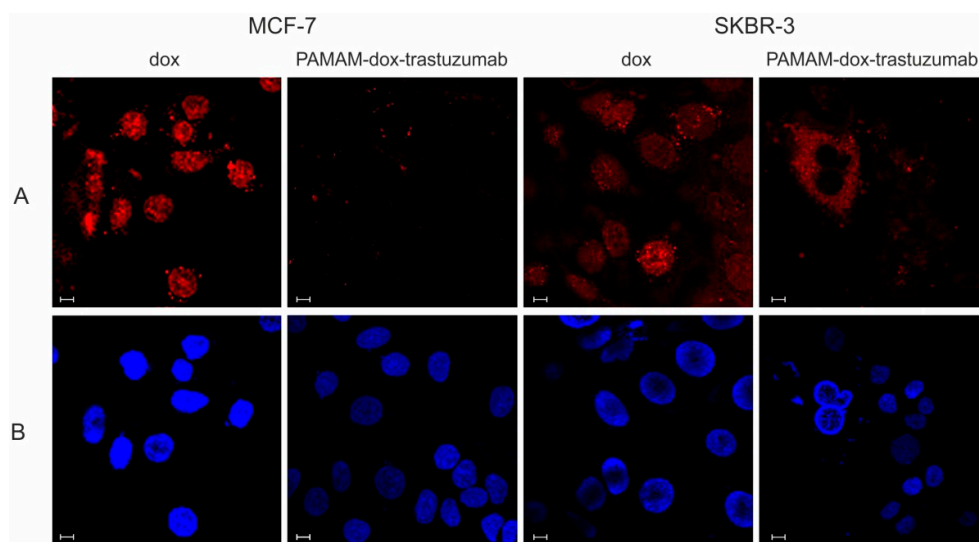


Figure 6. Confocal images of MCF-7 and SKBR-3 cells treated with 1 μ M free doxorubicin and PAMAM–dox–trastuzumab conjugate for 24 h. Following doxorubicin and conjugate accumulation (red channel) (A), cells were rinsed once with PBS and stained with DAPI to visualize cell nucleus (blue channel) (B). The size of the scale bar is 10 nm.

Images confirm internal localization of the compounds. As expected, free doxorubicin was localized internally in all tested cell lines but when it comes to PAMAM–dox–trastuzumab conjugate, some differences in localization can be observed between tested cell lines. In the case of SKBR-3 cells, conjugate was internalized to cell nucleus while in MCF-7 cells was almost not present there, which was in parallel with our cytotoxicity and uptake studies. Furthermore, trastuzumab labeled by doxorubicin was visible on the surface of the cells and in the cytoplasm. Interestingly, the interaction of the monoclonal antibody and only a small amount of doxorubicin, which binds to nucleic acids, was needed to ensure high efficacy of the conjugate. To the best of our knowledge,

this the first example of the study of the localization of PAMAM–dox–trastuzumab in the cells. Others researchers were investigating the internalization of dendrimer–antibody conjugate in the cells. Miyano et al. used PAMAM G6 dendrimers modified on the surface with lysine and glutamic acid (KG6E) and with attached trastuzumab [22]. Studies with this conjugate were also carried out on two human breast cancer cell lines: SKBR-3 (HER-2 positive) and MCF-7 (HER-2 negative). After 1 h incubation at 4 °C, KG6E–trastuzumab–Alexa Fluor 488 conjugate was selectively bound to SKBR-3 cells, rather than MCF-7. Moreover, the conjugate was internalized to lysosomes. In other studies, trastuzumab was covalently linked to a PAMAM dendrimer via bifunctional polyethylene glycol (PEG) and tested towards two cell lines BT474 (HER-2 positive) cells and MCF-7 (HER-2 negative) cells [23]. These in vitro studies demonstrated that PAMAM–trastuzumab conjugate was taken up by HER-2-overexpressing BT474 cells more efficiently than MCF-7 cells that expressed lower levels of HER-2. Co-localization experiments indicated that trastuzumab-conjugated PAMAM was located in the cytoplasm. These findings provide utilizable information for design conjugate for targeted therapy.

4. Conclusions

In summary, we have successfully synthesized and characterized HER-2 targeted PAMAM–dox–trastuzumab conjugate. The in vitro cytotoxicity, cellular uptake and internalization studies indicate that this conjugate is a promising carrier for HER-2-expressing tumor-selective delivery. The selectivity is not only due to trastuzumab that binds to human epidermal growth factor receptor 2 but also due to pH-sensitive linker between dendrimer and doxorubicin that in the tumor environment breaks allowing to drug release. PAMAM–dox–trastuzumab conjugate can find application in the drug delivery system and enhance the therapeutic index of anticancer drug while reducing its dose.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/2/187/s1>, Figure S1: The ¹H NMR spectrum of PAMAM–dox conjugate, Figure S2: The FTIR spectrum of PAMAM–dox, Figure S3: RP–HPLC profile of PAMAM G4, trastuzumab and PAMAM–dox–trastuzumab conjugate analysis.

Acknowledgments: This work was sponsored by the National Science Centre (Project: “Nanoparticle conjugates with the monoclonal antibody—a new opening in target tumor therapy” UMO-2015/19/N/NZ3/02942).

Author Contributions: The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. Monika Marcinkowska and Anna Janaszewska conceived and designed the experiments; Monika Marcinkowska and Ewelina Sobierajska performed the experiments; Maciej Stanczyk and Arkadiusz Chworos analyzed the data; Ewelina Sobierajska, Arkadiusz Chworos and Barbara Klajnert-Maculewicz wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Donepudi, M.S.; Kondapalli, K.; Amos, S.J.; Venkanteshan, P. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* **2014**, *10*, 506–511. [PubMed]
2. Zhang, Y.; Hong, H.; Cai, W. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4185–4194. [CrossRef] [PubMed]
3. Scott, A.M.; Allison, J.P.; Wolchok, J.D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* **2012**, *12*, 14. [PubMed]
4. Fountzilas, G.; Tsavdaridis, D.; Kalogera-Fountzila, A.; Christodoulou, C.; Timotheadou, E.; Kalofonos, C.; Kosmidis, P.; Adamou, A.; Papakostas, P.; Gogas, H.; et al. Weekly paclitaxel as first-line chemotherapy and trastuzumab in patients with advanced breast cancer. A Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 1545–1551. [CrossRef] [PubMed]
5. Pegram, M.; Hsu, S.; Lewis, G.; Pietras, R.; Beryt, M.; Sliwkowski, M.; Coombs, D.; Baly, D.; Kabbinnavar, F.; Slamon, D. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* **1999**, *18*, 2241–2251. [CrossRef] [PubMed]
6. Wu, A.M.; Senter, P.D. Arming antibodies: Prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137–1146. [CrossRef] [PubMed]

7. Wilczewska, A.Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K.H.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 1020–1037. [[CrossRef](#)]
8. Jackson, J.L.; Chanzy, H.D.; Booy, F.P.; Drake, B.J.; Tomalia, D.A.; Bauer, B.; Amis, E.J. Visualization of dendrimer molecules by transmission electron (TEM): Staining methods and Cryo-TEM of vitrified solutions. *Macromolecules* **1998**, *31*, 6259–6265. [[CrossRef](#)]
9. Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N.K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 268–307. [[CrossRef](#)]
10. Alper, J. Rising chemical “stars” could play many roles. *Science* **1991**, *251*, 1562–1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Boas, U.; Heegaard, P.M.H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications—Reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 2106–2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Menjoge, A.R.; Kannan, R.M.; Tomalia, D.A. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: Design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 171–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Barratt, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 163–171. [[CrossRef](#)]
15. Byrne, J.D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1615–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Talekar, M.; Kendall, J.; Denny, W.; Garg, S. Targeting of nanoparticles in cancer: Drug delivery and diagnostics. *Anticancer Drugs* **2011**, *22*, 949–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Esfand, R.; Tomalia, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 427–436. [[CrossRef](#)]
18. Yabbarov, N.G.; Posypanova, G.A.; Vorontsov, E.A.; Popova, O.N.; Severin, E.S. Targeted delivery of doxorubicin: Drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry* **2013**, *78*, 884–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zhu, S.; Hong, M.; Zhang, L.; Tang, G.; Jiang, Y.; Pei, Y. PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: In vitro evaluation and in vivo tumor accumulation. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 161–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shukla, R.; Thomas, T.P.; Desai, A.M.; Kotlyar, A.; Park, S.J.; Baker, J.R. HER2 specific delivery of methotrexate by dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 295102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kulhari, H.; Pooja, D.; Shrivastava, S.; Kuncha, M.; Naidu, V.G.M.; Bansal, V.; Sistla, R.; Adams, D.J. Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Miyano, T.; Wijagkanalan, W.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Anionic amino acid dendrimer-trastuzumab conjugates for specific internalization in HER2-positive cancer cells. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1318–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ma, P.; Zhang, X.; Ni, L.; Li, J.; Zhang, F.; Wang, Z.; Lian, S.; Sun, K. Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 2173–2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody – trastuzumab: The new approach of a well-known strategy

Monika Marcinkowska¹, Ewelina Sobierajska¹, Maciej Stanczyk², Anna Janaszewska¹, Arkadiusz Chworos³, Barbara Klajnert-Maculewicz^{1,4}

¹ *Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland*

² *Department of Surgical Oncology, Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland*

³ *Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-236 Lodz, Poland*

⁴ *Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany*

Abstract

The strategy utilizing trastuzumab, a humanized monoclonal antibody against human epidermal growth receptor 2 (HER-2), as a therapeutic agent in HER-2 positive breast cancer therapy seems to have advantage over traditional chemotherapy especially when given in combination with anticancer drugs. However, the effectiveness of single antibody or antibody conjugated with chemotherapeutics is still far from ideal. Antibody-dendrimer conjugates hold the potential to improve the targeting and release of active substance at the tumor site. In the present study, we developed and synthesized PAMAM dendrimer-trastuzumab conjugates carrying doxorubicin (dox) specifically to cells overexpressing HER-2. ¹HNMR, FTIR and RP-HPLC was used to analyze the characterize the products and to analyze their purity. Toxicity of PAMAM-trastuzumab and PAMAM-dox-trastuzumab conjugates compared with free trastuzumab and doxorubicin, towards HER-2 positive (SKBR-3) and negative (MCF-7) human breast cancer cell lines was determined using MTT assay. Furthermore, the cellular uptake and cellular localization were studied by flow cytometry and confocal microscopy, respectively. A cytotoxicity profile of above mentioned compounds indicated that conjugate PAMAM-dox-trastuzumab was more effective when compared to free drug or the conjugate PAMAM-trastuzumab. Moreover, these results reveal that trastuzumab can be used as a targeting agent in PAMAM-dox-trastuzumab conjugate. Therefore PAMAM-dox-trastuzumab conjugate might be an interesting proposition which could lead to improvements in the effectiveness of drug delivery systems for tumors that overexpress HER-2.

Synthesis of PAMAM doxorubicin conjugate

^1H NMR and FTIR was used to analyze the purity of PAMAM-dox conjugate. ^1H NMR spectra were recorded on Bruker Avance III DRX-600 and 500 MHz spectrometers, using deuterated D_2O as solvents. The FTIR spectra were collected with a FTIR ATI Mattson Spectrometer Spectrum and samples were measured as thin film in KBr crystals.

As shown in Figure S1, the peaks at 7.7 ppm resulted from aryl groups and 5.15 ppm, 0.94 ppm for alkyl group of the doxorubicin. The 6.5 ppm signal refers to the CAA linker. The peaks at 2.2-3.2 ppm correspond to protons of PAMAM dendrimer.

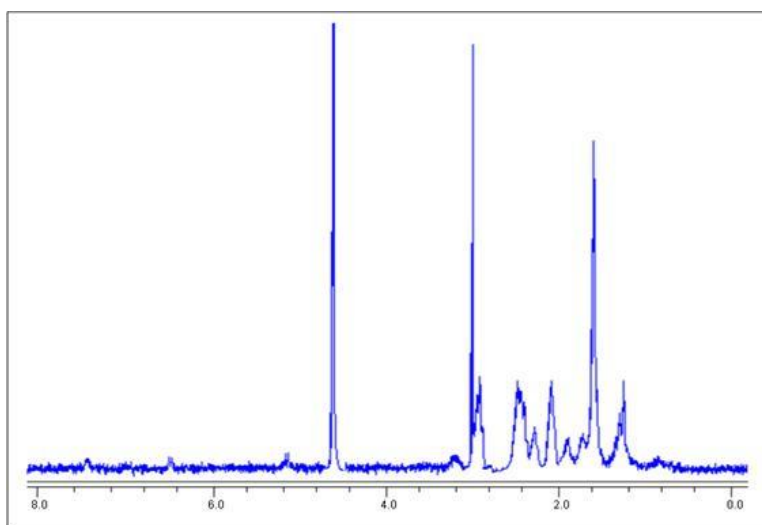


Figure S1. The ^1H NMR spectrum of PAMAM-dox conjugate

According to FTIR, the typical peak attributed to NH groups of the conjugate was observed at 1637 cm^{-1} . The broad band at 3416 cm^{-1} corresponds to O-H. The N-H bond from PAMAM appears at 1550 , 1465 , 1364 cm^{-1} . The bands at 2849 , 2837 cm^{-1} and 1153 cm^{-1} are attributed to C-H and C-O-C groups of doxorubicin respectively. In the IR spectrum of PEG- dox the peak at 3416 cm^{-1} is attributed to OH and N-H groups. The FTIR spectrum of PAMAM-dox is shown on the Figure S2.

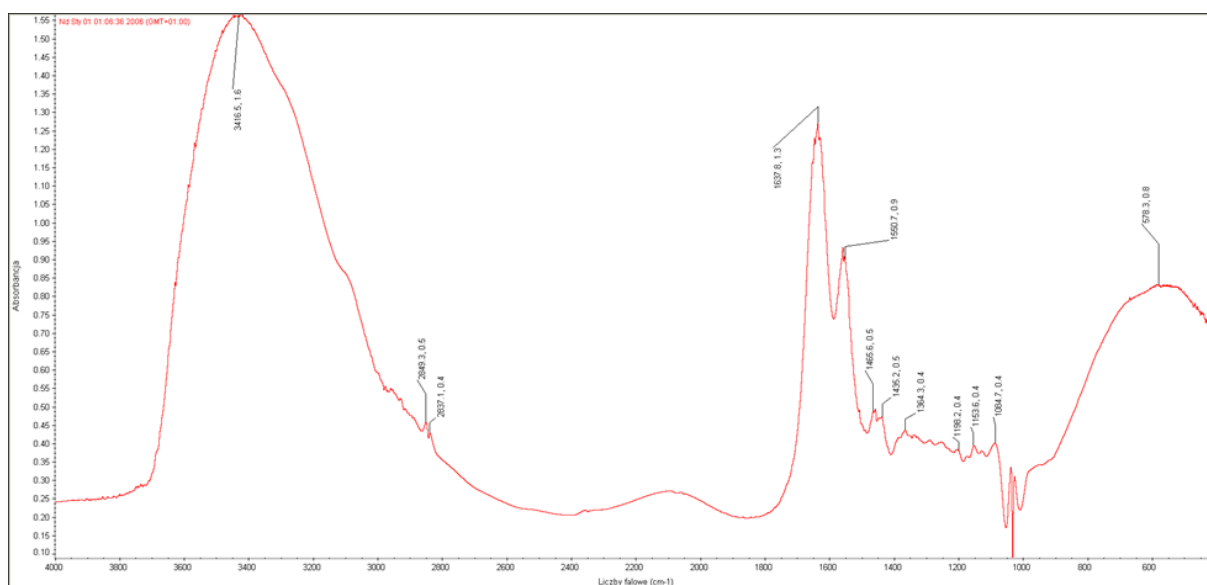


Figure S2. The FTIR spectrum of PAMAM-dox

2. Synthesis of PAMAM-dox-trastuzumab conjugate

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the purity of products and to ascertain the level of PAMAM, PAMAM-dox and trastuzumab conjugation (Figure S3). Solvents used for HPLC analysis were at the HPLC grade; i PrOH, MeOH, MeCN was from Sigma-Aldrich, trifluoroacetic acid from J.T.Baker (9470) and Milli-Q water. All experiments were performed on two FPLC/HPLC systems: (1) AKTA Purifier two pumps system equipped with UV-900 monitoring, pH and conductivity probe and fraction collector Frac-920. Analysis using AKTA was performed at room temperature 25°C, (2) Shimadzu Prominence UFLC system equipped with LC-20AD isocratic pumps with RF-20A fluorescence detector, SPD-M20A diode array detector for UV-Vis monitoring and CTO-20ASvp column oven that was setup at 75°C. Initially SOURCE uRPC C2/C18 ST 4.6/100 column was used, but it appeared to be too hydrophobic for dendrimer and antibody analysis, therefore for all presented results Jupiter 4u Proteo 90A 2.0/100 column was used.

Figure S3. shows RP-HPLC profile of PAMAM analysis performed on AKTA Purifier system with constant UV monitoring at 3 wavelengths (220, 240 and 280 nm), pH and conductivity at 25°C. The elution system was optimized and finally contained A: 0.1% TFA in water, B: 70% i PrOH, 20% MeCN, 0.1% TFA in water. In the gradient 0-80% for 30 min the main product (PAMAM dendrimer) appeared at 5.8 min with the purity estimated for 96.8%.

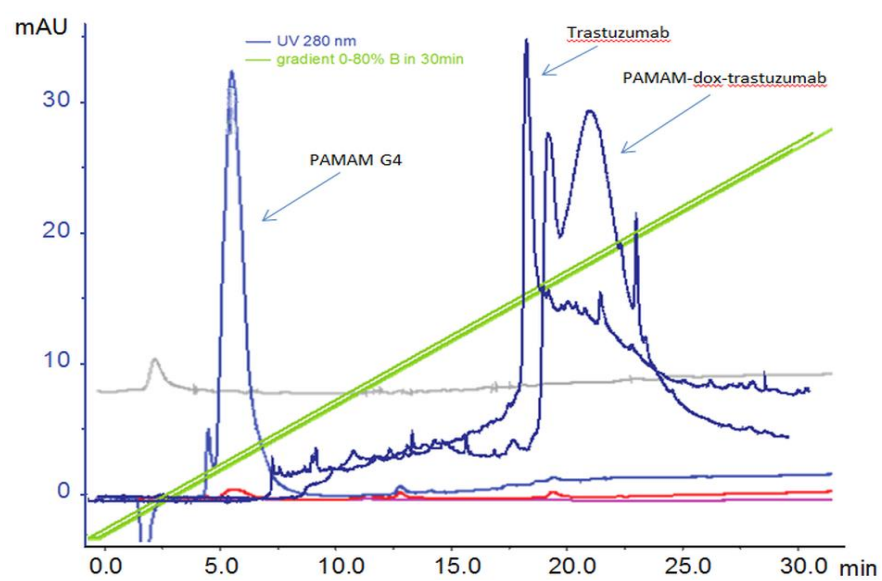


Figure S3. RP-HPLC profile of PAMAM G4, trastuzumab and PAMAM-dox-trastuzumab conjugate analysis

28.08.2019

mgr Monika Marcinkowska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, syntezie i charakterystyce badanych związków, wykonaniu zdjęć konfokalnych, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 45%.

Monika Marcinkowska

28.08.2019

mgr Ewelina Sobierajska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na wykonaniu oznaczeń żywotności komórek, oznaczeń szybkości wnikania związków do komórek, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 20%.

Sobierajska Ewelina

28.08.2019

dr n. med. Maciej Stańczyk

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika

ul. Pabianicka 62

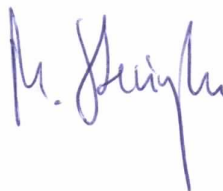
93-513 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 20%.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Stańczyk', is positioned in the lower right area of the document.

28.08.2019

dr hab. Anna Janaszewska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy.

Mój wkład oceniam na 5%.

A. Janaszewska

28.08.2019

dr hab. Arkadiusz Chworoś

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

ul. H. Sienkiewicza 112

90-363 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na wykonaniu oznaczeń HPLC, analizie danych i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

Arkadiusz Chworoś

28.08.2019

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Eweliny Sobierajskiej, Macieja Stańczyka, Anny Janaszewskiej, Arkadiusza Chworosia, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 5%.

B. Klajnert-Maculewicz

Received: 2014.12.14
Accepted: 2015.07.30
Published: 2015.12.03

Przeciwciało monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi

Trastuzumab – a monoclonal antibody – and dendrimers in a targeted therapy for breast cancer

Monika Marcinkowska¹, Maciej Stańczyk², Barbara Klajnert-Maculewicz^{1,3}

¹ Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

² Oddział Chirurgii Onkologicznej, Regionalny Ośrodek Onkologiczny, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Kopernika w Łodzi

³ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Niemcy

Streszczenie

Rak piersi to najczęściej występujący nowotwór u kobiet. Dane literaturowe potwierdzają, iż u około 30% pacjentek występuje nadekspresja receptora nabłonkowego czynnika wzrostu HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2) na powierzchni komórek nowotworowych. Przeciwciało białku HER2 skierowany jest trastuzumab - rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne. Wzbogacenie nim tradycyjnej chemioterapii, z zastosowaniem antracyklin czy taksonów, zwiększa skuteczność leczenia. Jednak ogólnoustrojowa toksyczność samych leków nadal stanowi poważny problem. Z tego powodu poszukuje się nowych rozwiązań, zwłaszcza na poziomie selektywnego transportu leku do komórki nowotworowej.

Dendrymery, zbudowane z rdzenia oraz promieniście odchodzących od niego gałęzi, są jedną z najlepiej poznanych grup nanocząsteczek. Liczne publikacje wskazały, iż mogą być wykorzystane jako nośniki różnego typu cząsteczek, m.in. leków przeciwnowotworowych. Ich rozgałęziona struktura zapewnia skuteczną ochronę przed przedwczesnym uwalnianiem leku w układzie krążenia, dzięki czemu istnieje szansa na zmniejszenie dawki przy zachowaniu zbliżonego działania terapeutycznego i jednoczesnym obniżeniu toksyczności leku względem komórek prawidłowych. Ponadto modyfikacja powierzchni dendrymeru przeciwciałem monoklonalnym zapewnia skutek terapii celowanej. Dlatego tak ważną jest synteza koniugatów trastuzumabu, dendrymerów oraz leków przeciwnowotworowych. W pracy przedstawiono przegląd publikacji dotyczący zastosowania trastuzumabu *in vitro*, *in vivo* oraz wykorzystania go w badaniach klinicznych, a także najnowsze osiągnięcia z pogranicza biologii i chemii, których celem jest stworzenie idealnego przenośnika, mogącego znaleźć zastosowanie w terapii celowanej.

Słowa kluczowe:

dendrymery PAMAM • trastuzumab • rak piersi • przeciwciało

Summary

Breast cancer is the most frequently occurring cancer in women. It has been confirmed that approximately 30% of patients have overexpression of human epidermal growth factor 2 (HER2) on the surface of tumor cells. Trastuzumab – a recombinant, humanized monoclonal antibody – is directed against this receptor. Its use in traditional chemotherapy (with anthracyclines or taxanes) causes an increase of therapy efficiency. However, the systemic toxicity of the anticancer drugs is still a serious problem. Therefore, new solutions are sought, especially in the field of selective drug transport to tumor cells. Dendrimers are composed of a core and branches. They are the best-

Key words:	-known group of nanoparticles. A lot of publications have shown that they can be used as carriers of various types of molecules, including anticancer drugs. The branched structure provides effective protection against premature release of the drug into the circulatory system. It gives a chance to reduce the dose while maintaining a therapeutic effect, and to reduce the toxicity of the drug for normal cells. Furthermore, the surface of dendrimers can be modified by a monoclonal antibody to achieve a targeted therapy. For that reason synthesis of conjugates of trastuzumab, dendrimers, and anticancer drugs is so crucial. This paper presents an overview of publications about the use of trastuzumab in <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> and clinical studies, as well as the latest developments of biology and chemistry, whose goal is to create the perfect, targeted carrier. PAMAM dendrimers • trastuzumab • breast cancer • antibody
Full-text PDF: Word count: Tables: Figures: References:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1184555 4503 – 3 83

Adres autorki: mgr dr Monika Marcinkowska, Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: m_monika123@interia.eu

WSTĘP

Procesy, takie jak różnicowanie, proliferacja czy apoptoza są ściśle regulowane w każdej żywej komórce i zależą w znacznym stopniu od czynników zewnętrznych aktywujących wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnałów. Akumulacja mutacji w komórkach nowotworowych jest bezpośrednią przyczyną zaburzeń w przekazywaniu, czego konsekwencją jest niekontrolowany podział komórek nowotworowych oraz brak reakcji na sygnały, które w warunkach prawidłowych aktywują szlaki apoptotyczne. Poznając etiologię chorób nowotworowych stwierdza się, że jednym z najczęściej występujących zaburzeń w przekazywaniu sygnałów jest szlak związany z rodziną receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [23].

U około 30% pacjentek, u których potwierdzono raka piersi zaobserwowano również nadekspresję receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) na powierzchni komórek nowotworowych [8]. Receptor ten, w literaturze opisywany za pomocą skrótów: NEU; CD340; ERBB2; MLN 19; HER-2/neu pełni bardzo ważną funkcję w kontroli prawidłowego podziału komórki czy regulacji procesu apoptozy.

Gen *ERBB2* kodujący białko HER2 jest protoonkogenem i leży na długim ramieniu siedemnastego chromosomu (17q12). Jego zwielokrotnienie (amplifikacja) jest przyczyną nadmiernej ekspresji białka HER2 w komórce nowotworowej. Uważa się, że jedna trzecia z rozpoznanych przypadków raka piersi ma zbyt wiele kopii tego genu, czego naturalną konsekwencją jest nadekspresja recep-

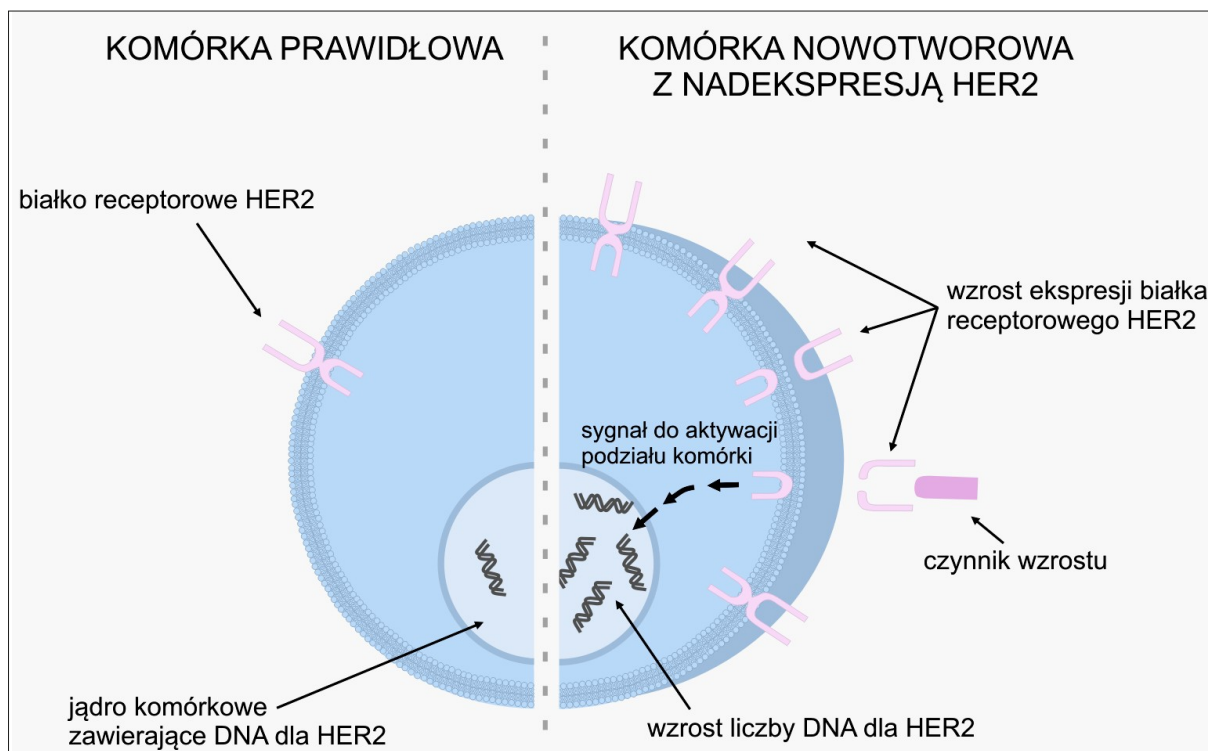
tora HER2 [11,68]. Anomalia ta niesie za sobą poważne konsekwencje, ponieważ prowadzi do szybszego wzrostu raka oraz agresywniejszego przebiegu choroby. Udowodnione, iż nowotwory z nadekspresją receptora HER2 wykazują także większą lekooporność [74], dlatego decydując o sposobie leczenia raka piersi tak ważne jest aby zbadać liczbę kopii genu *ERBB2*, a co się z tym wiąże ocenić „złośliwość” nowotworu oraz szanse pacjentki na wyleczenie. Jeśli liczba kopii genu *ERBB2* przekroczy 4 zakłada się, że nastąpiła amplifikacja. Jako kryteria oceny kopii genu, przyjmuje się następującą klasyfikację:

- poniżej 4 kopii genu/komórkę – brak amplifikacji,
- 5-10 kopii genu/komórkę – niska amplifikacja,
- powyżej 10 kopii genu/komórkę – wysoka amplifikacja [51].

Powstające w wyniku ekspresji genu *ERBB2* białko należy do rodziny czterech, transbłonowych, silnie ze sobą związanych oraz wchodzących w interakcje receptorów, tj.:

- ERBB1 (HER2, EGFR)
- ERBB2 (HER2)
- ERBB3 (HER3)
- ERBB4 (HER4)

Wszystkie cztery receptory należą do transbłonowych białek i zawierają wiążącą ligand domenę zewnątrzkomórkową, domenę transbłonową oraz domenę wewnątrzkomórkową wykazującą aktywność kinazową [12]. Po związaniu HER2 z ligandem receptor ulega homo- lub heterodimeryzacji będącej skutkiem autofosforylacji reszt tyrozyny w domenie cytoplazmatycznej. Reakcja uruchamia wiele szlaków sygnałowych, tj.: kinaz białkowych aktywowanych mitogenem



Ryc. 1. Mechanizm działania nadekspresji HER 2

(MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases) [44], fosfolipaz C γ , kinaz białkowych C (PKC, Protein Kinase C) oraz aktywatora transkrypcji (STAT, Signal Transducers and Activators of Transcription). Konsekwencją zwiększenia gęstości występowania receptora HER2 na powierzchni komórki jest ekspresja białek biorących udział w proliferacji, przeżyciu i migracji komórek, a także zapoczątkowanie procesu angiogenezy, będącego pierwszym etapem prowadzącym do przerzutowania [45]. Rycina 1 przedstawia mechanizm działania i nadekspresji receptora HER2 w komórce.

Trastuzumab to rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne (mAb, Monoclonal Antibody) klasy IgG1 wybiórczo łączące się z EGFR2. Wiążąc się z IV domeną zewnątrzkomórkowej części białka HER2 trastuzumab blokuje receptor hamując nadmierną proliferację komórek guza. Wyniki badań sugerują, że zahamowanie proliferacji jest rezultatem zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [35,37].

Zaobserwowano również, iż trastuzumab jest silnym mediatorem cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC, Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) [1,34].

BADANIA *IN VITRO*

Potrzeba obniżenia toksyczności stosowanych leków przeciwnowotworowych, przy jednoczesnym zwiększeniu ich skuteczności, zaowocowała wzrostem zainteresowania badaniami nad terapią celowaną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych [24].

Dotychczas zbadano wpływ trastuzumabu m.in. na żywotność komórek (test tetrazoliowy), cykl komórkowy (barwienie jodkiem propidyny), apoptozę (kaspazy egzekutorowe i aneksyna V), ekspresję receptora HER2 na powierzchni komórek SK-BR3 oraz receptora estrogenowego na powierzchni komórek gruczołowego raka sutka (MCF-7), przy jednoczesnej kontroli wpływu dwóch endogennych ligandów: czynn timer wzrostu naskórka (EGF) i hereguliny- β 1 (HRG- β 1). Zaobserwowano, że przeżywalność komórek SK-BR3 zmniejsza się po ekspozycji na trastuzumab. Jest to związane ze spadkiem względnej gęstości receptora HER2 oraz zatrzymaniem cyklu w fazie G1, wspieranych przez cytostatyczne działanie trastuzumabu. Ilość aktywnego receptora HER2 jest znacznie redukowana przez trastuzumab, EGF i heregulinę- β 1 [35].

Liu i wsp. zbadali wpływ kombinacji przeciwciała MM-121/SAR256212 oraz trastuzumabu [33]. MM-121/SAR256212 to ludzkie przeciwciało skierowane przeciwko nadekspresji receptora HER3. Do badania przeżywalności wykorzystano metodę MTS (z użyciem 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazolu). Za pomocą cytometrii przepływowej dokonano oceny cyklu komórkowego, a metodę Western blot zastosowano do wykrycia ekspresji białek na powierzchni komórek nowotworowych. Okazało się, że przeciwciało MM-121/SAR256212 w znacznym stopniu wzmacnia hamujący wpływ trastuzumabu na dwie badane linie komórkowe raka piersi (SK-BR3 i BT474). Przeciwciało MM-121 podane w połączeniu z trastuzumabem powodowało znaczący spadek ekspresji ufosforylowanych

białek ERBB3 (P-ERBB3) i AKT (P-AKT). Stosowane jednocześnie przeciwciała nie indukowały jednak apoptozy w liniach komórkowych opornych na działanie trastuzumabu, a jedynie prowadziły do zatrzymania cyklu w fazie G1. Natomiast obserwowano zwiększenie ekspresji białka p27^{kip1} [33].

Interesujące okazały się wyniki barwienia immunohistochemicznego (IHC, Immunohistochemistry), cytometrii przepływowej, PCR w czasie rzeczywistym oraz ocena amplifikacji genu za pomocą fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH, Fluorescent *in situ* Hybridization), które wykazały znaczący wpływ trastuzumabu podawanego z innym przeciwciałem monoklonalnym - pertuzumabem, którego działanie jest skierowane również przeciwko receptorowi HER2, na liniach komórkowych raka piersi USPC ARK-1, USPC ARK-2, USPC ARK-3, USPC ARK-4, USPC ARK-5 i USPC ARK-6. Trzy z badanych linii komórkowych wykazały amplifikację genu *C-ERBB2* oraz wysoką ekspresję receptora HER2 [26]. Obserwowana cytotoksyczność trastuzumabu i pertuzumabu oceniona na podstawie wyników proliferacji była na podobnym poziomie, choć przeciwciała podane jednocześnie hamowały w znacznym stopniu proliferację badanych komórek oraz indukowały cytotoksyczność zależną od ich stężenia [7].

Obecnie prowadzi się badania nad pochodną trastuzumabu, trastuzumab-DM1 (T-DM1), stosowaną w przypadku nabycia przez komórki nowotworowe oporności na leczenie tradycyjnym przeciwciałem. W eksperymentach *in vitro* wykorzystano linie komórkowe: UACC-893, MDA-453 i JIMT-1. Do badania przeżywalności komórek zastosowano test AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Zaobserwowano, że pochodna w znaczący sposób hamuje przeżywalność HER2-dodatnich komórek nowotworowych opornych na trastuzumab. Ponadto T-DM1, podobnie jak trastuzumab, wywołuje selektywną cytotoksyczność [4].

W raku piersi trastuzumab podawany jest z taksanami [28], dlatego też prowadzone są badania mające na celu ocenę synergistycznego działania przeciwciała podawanego z paklitaksem lub docetaksem. Niestety otrzymane wyniki IC₅₀ oraz wartości IC₃₀-IC₇₀ nie potwierdziły synergistycznego działania leków i przeciwciała, a zaobserwowano jedynie ich addytywny wpływ na badane linie komórkowe MCF-7, MDA-MB453 i SK-BR3 [47].

Natomiast synergiczną cytotoksyczność trastuzumabu względem linii komórkowej SK-BR3 obserwowano po podaniu przeciwciała w połączeniu z lekami, takimi jak: tiotepa, cisplatyna, etopozyd. Addytywne interakcje były obserwowane również dla doksorubicyny i metotraksatu. Podczas gdy interakcje fluorouracylu z trastuzumabem wykazywały charakter antagonistyczny [56].

Badania innego zespołu wykazały, iż trastuzumab hamuje klonalny wzrost komórek BT-474 już w dawce 0,5-2,5 nM oraz SK-BR3 w dawce 0,5-10 nM i w mniejszym stopniu komórek raka jajnika (w dawce 10-100 nM). W terapii

skojarzonej trastuzumabu i paklitakselu obserwowano wzmocnienie przeciwnowotworowego efektu odpowiednio o 67% w przypadku komórek BT-474, 50% dla linii SK-BR3 i o 32% dla linii raka jajnika SK-OV3 [6].

Terapia skojarzona trastuzumabu i leków antyestrogenowych może nasilać hamowanie wzrostu niektórych rodzajów guzów [59]. Trastuzumab w dawce 0,05-0,2 mg/l podany w połączeniu z tamoksyfenem (w stężeniu 0,5-5 μM) będącym selektywnym modulatorem receptora estrogenowego (SERM, Selective Estrogen Receptor Modulators), znacząco wzmacniał przeciwnowotworowe działanie leku wobec HER2-opornej linii komórkowej BT-474 [80]. Trastuzumab podawany z fulysteranem - innym antyestrogenowym lekiem - hamował wzrost komórek raka piersi linii ML-20. Natomiast nie obserwowano efektu terapeutycznego w przypadku linii komórkowych niewykazujących ekspresji receptora estrogenowego, charakteryzujących się niską ekspresją receptora HER2 (KPL-4, MDA-MB-231) [41].

Podobnie podanie CP461 (inhibitora fosfodiesterazy cGTP stosowanego w przypadku raka prostaty) z trastuzumabem spowodowało hamowanie proliferacji oraz generację procesu apoptozy. Komórki linii BT-474 wykazujące nadekspresję HER2 traktowane trastuzumabem i CP461 wykazywały wzrost inhibicji, w przeciwieństwie do komórek linii MDA-MB-435S, wykazujących niską ekspresję receptora EGFR2. Jednoczesne podanie obu aktywnych substancji hamowało wzrost komórek linii SK-BR3 i BT-474 i dodatkowo powodowało fragmentację DNA w komórkach SK-BR3 [78].

BADANIA *IN VIVO*

Zastosowanie modeli zwierzęcych, bardziej złożonych niż model komórkowy, stanowi kolejny etap badań związków, które wykazują potencjalne działanie przeciwnowotworowe względem linii komórkowych. Możliwość wykonania heterogennych przeszczepów komórek ludzkich nowotworów do organizmów zwierzęcych daje badaczom unikalną możliwość sprawdzenia skuteczności przeciwnowotworowego działania badanych związków *in vivo*.

Baselg i wsp. zaobserwował korelację między podaną *in vivo* dawką trastuzumabu, a efektywnością działania przeciwnowotworowego. Grupie 24 myszy pozbawionym grasicy, z uprzednio wykonanym heteroprzeszczepem ludzkich komórek raka piersi wykazujących nadekspresję receptora HER2 podawano w dawkach: 0,1, 0,3 i 1 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo jeden raz na tydzień przez 5 tygodni przeciwciała, które hamowało wzrost guza wprost proporcjonalnie do podanej dawki w 25, 40 i 80% w porównaniu do myszy, którym podawano przeciwciała kontrolne (1 mg/kg dootrzewnowo) nieswoistej rekombinowanej immunoglobuliny [6].

Myszom z utrwalonymi heteroprzeszczepami nowotworowymi komórek linii BT-474 podawano trastuzumab dootrzewnowo w dawce 0,3 mg/kg masy ciała dwa razy

w tygodniu przez 5 tygodni w monoterapii lub w połączeniu z doksorubicyną lub paklitakselem. Monoterapia trastuzumabem, doksorubicyną oraz paklitakselem spowodowała zmniejszenie objętości guza odpowiednio o 36, 27 i 35%. Dopiero zastosowanie trastuzumabu w połączeniu z paklitakselem, stosowanym w dawce 10 mg/kg i podawanym dożylnie w pierwszym i czwartym dniu leczenia redukowało objętość guza o 93%, w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast trastuzumab w połączeniu z doksorubicyną podawany dożylnie w stężeniu 10 mg/kg zahamował wzrost guza o 70% [56].

Wyniki innych badań wykazały, iż leczenie trastuzumabem wraz z paklitakselem powoduje znaczące zahamowanie wzrostu guza nawet po podaniu niższych dawek paklitakselu (5 lub 10 mg/kg). Trastuzumab w połączeniu z doksorubicyną, cyklofosfamidem, metotreksatem [71], etopozydem lub winblastyną [20] zmniejszał wielkość guza u myszy pozbawionych grasic, z heteroprzeszczepami ludzkich komórek raka piersi wykazującymi nadekspresję receptora HER2. Jednak zaobserwowano, iż nie było to synergistyczne, gdy leki podawano w różnym czasie. Ponadto, gdy doksorubicyna była podawana jako pierwsza to działanie z trastuzumabem było antagonistyczne [80].

Leahy i wsp. wykazali, iż guzy z nadekspresją HER2 wykazują zahamowanie wzrostu ilości zewnątrzkomórkowej domeny (ECD, Extracellular Domain) HER2 jako skutek leczenia trastuzumabem [20]. Związek między masą guza, ekspresją ECD i odpowiedzią na terapię liposomalną doksorubicyną (100 µg jeden raz w tygodniu) oraz trastuzumabem został sprawdzony na grupie 80 myszy z utrwalonym heteroprzeszczepem linii BT-474 i MCF7. Trastuzumab powodował zależny od dawki wzrost w poziomie cyrkulacji HER2 ECD. Tak jak trastuzumab, liposomalna doksorubicyna znacznie hamowała wzrost guza, ale w przeciwieństwie do trastuzumabu nie wykazywała znaczącego wpływu na zależność regresji między ilością ECD HER2 oraz objętością guza w odniesieniu do kontrolnego roztworu soli fizjologicznej [55].

ZASTOSOWANIA KLINICZNE

Trastuzumab został zarejestrowany w 2001 roku, początkowo w terapii rozlanego raka piersi z nadekspresją HER2. Status rejestracyjny w Polsce w leczeniu uzupełniającym, czyli adiuwantowym, raka piersi uzyskał w 2006 roku [19]. Trastuzumab okazał się skuteczny w licznych badaniach klinicznych dotyczących raka piersi z nadekspresją HER2. Jego działanie polega na inhibicji sygnału do jądra komórkowego, w wyniku czego dochodzi do zahamowania proliferacji komórki. Dodatkowo uaktywnia cytotatyczną funkcję układu dopełniacza oraz przeciwciał w stosunku do komórki HER2(+) [69,70]. Jego działanie może zostać dodatkowo wzmocnione poprzez inne leki cytotatyczne [76]. Obecność receptora HER2 stwierdza się prawie u 20% chorych na raka piersi [15]. Leczenie trastuzumabem może być zastosowane wyłącznie w tej grupie chorych.

Trastuzumab początkowo stosowano u chorych z zaawansowaną, rozlaną chorobą nowotworową po leczeniu pierwszego rzutu i po nawrocie. Liczne badania kliniczne potwierdziły skuteczność trastuzumabu w takich przypadkach terapii raka piersi. Cobleigh i wsp. podając chorym w II rzucie leczenia – czyli po niepowodzeniu leczenia I rzutu – w rozsiewie choroby nowotworowej odnotowali obiektywną odpowiedź u 15% chorych [64]. Następnie w 2001 r. Slamon i wsp. badając skuteczność leczenia paklitakselem lub programem AC (doksorubicyna z cyklofosfamidem) w połączeniu z trastuzumabem lub bez trastuzumabu uzyskali odpowiedź na leczenie odpowiednio u 50% i 32% chorych ($p < 0,001$) oraz wydłużenie czasu do progresji (PFS, Progression Free Survival) o 7,4 miesiąca ($p < 0,001$). To samo badanie wskazało również, że skojarzenie doksorubicyny z trastuzumabem wywołuje dużą kardiotoxyczność, którą obserwowano u 27% chorych [64].

Biologia nowotworu z nadekspresją HER2. Obecnie w celu rozróżnienia rokowniczo-predykcyjnego raka piersi na podstawie fenotypu zobrażowanego w badaniu histopatologicznym i immunohistochemicznym podzielono go na kilka podtypów. Wyróżnione następujące podtypy: luminalny A, luminalny B – HER ujemny, luminalny B HER dodatni, HER dodatni (nieluminalny), trójujemny (bazalny) oraz podtyp zawierający tzw. „specjalne typy histologiczne”. Podtypy wykazujące nadekspresję HER2 są uznawane za podtypy o rokowaniu pośrednim, gdyż mimo potencjalnie większej złośliwości wdrożone leczenie anty HER2 jest bardzo skuteczne [32,36,62,66].

Biologiczny rozwój nowotworów HER2(+) jest szybszy, szybsza jest proliferacja komórek, zwiększona angiogeneza oraz inwazyjność, a zmniejszona apoptoza. Raki HER2(+) są często niewidoczne w badaniu mammograficznym, a zatem trudne do wykrycia we wczesnym stadium rozwoju guza. Fenotyp HER2(+) jest zazwyczaj stwierdzany u młodszych chorych, komórki nowotworu mają zazwyczaj większe jądra komórkowe i liczniej występują figury podziału w polu widzenia mikroskopu. Częściej, w przypadku nadekspresji HER2, dochodzi do przerzutów do węzłów chłonnych i towarzyszy temu ujemny status receptorów estrogenowych i progesteronowych – pośrednio związany z gorszym rokowaniem [75].

Leczenie raka piersi z nadekspresją HER2. Analiza 107 prac przeprowadzona przez zespół Ross, zawierająca ponad 40 000 obserwowanych chorych oraz inne prace wskazują, że do czasu wprowadzenia leczenia trastuzumabem obecność nadekspresji HER2 wiązała się ze zdecydowanie większą śmiertelnością w porównaniu z innymi podtypami raka piersi uwzględniając wiek, status społeczny, wielkość guza, stan węzłów chłonnych, stopień złośliwości oraz status receptorowy [60,67].

W przypadkach HER2(+) raka piersi częściej dochodzi do wznów w miejscu operowanym, zarówno w przypadku chirurgicznego leczenia oszczędzającego jak i amputacji piersi. Częściej również dochodzi do powstawania prze-

rzutów w płucach i w wątrobie, a rzadko guzy HER2(+) przerzutują do mózgu i kości [54]. Wprowadzenie celownego leczenia przeciw receptorowi HER2 zrewolucjonizowało sposób leczenia raka piersi HER2(+) oraz sprawiło, że średnie przeżycie w rozsiałym raku tego podtypu wynosi ponad 24 miesiące.

Obecnie trastuzumab jest stosowany zarówno w monoterapii jak i w połączeniu z innymi preparatami cytostatycznym lub z hormonoterapią. Najczęściej w terapii raka piersi łączy się paklitaksel i docetaksel. Skojarzenie jednoczesowe z antybiotykami antracyklinowymi, takimi jak epirubicyna i doksorubicyna, jest bardzo skuteczne, może jednak potęgować działania niepożądane w postaci wspomnianej dużej kardiotoksyczności.

Leczenie uzupełniające to leczenie pooperacyjne, którego zadaniem jest trwałe wyleczenie lub przynajmniej maksymalne wydłużenie czasu do progresji.

Podawanie leków dożylnie, ma za zadanie uzyskanie dawki terapeutycznej we wszystkich tkankach organizmu jednocześnie. Leczenie uzupełniające powinno się rozpocząć 2-4 tygodnie po zabiegu najpóźniej 3 miesiące po operacji. Zalecany czas trwania terapii to 12 miesięcy lub do nawrotu choroby. Z powodu kardiotoksyczności trastuzumabu w połączeniu z antracyklinami zaleca się podawanie 4 cykli AC. Następnie w kolejnych cyklach stosuje się połączenie taksoidów z trastuzumabem (czyli paklitakselu z trastuzumabem lub docetakselu z trastuzumabem); stosowane jest również połączenie docetakselu z karboplatiną i z trastuzumabem [48,54,57,68].

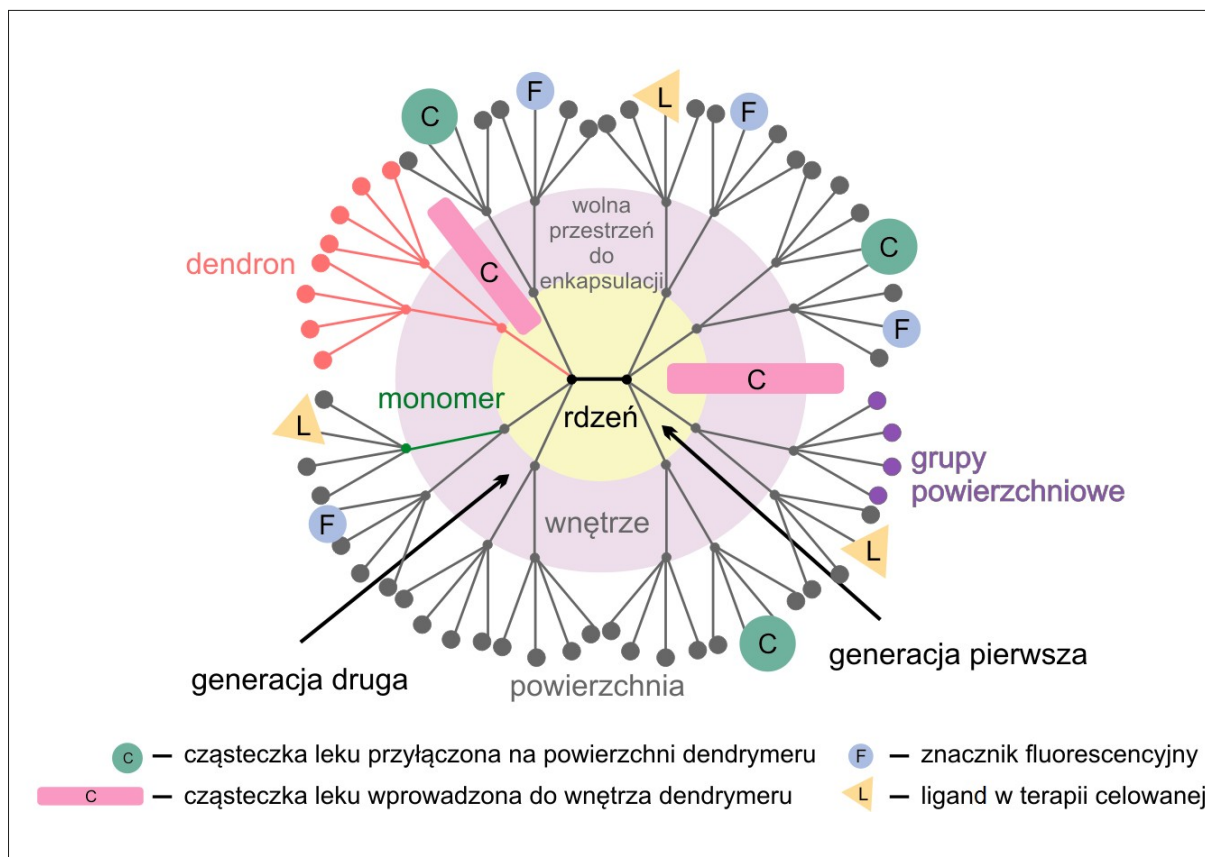
Leczenie wstępne czyli neoadiuwantowe prowadzi się w terapii miejscowo lub regionalnie zaawansowanego nieoperacyjnego pierwotnie raka piersi, kiedy wielkość guza przekracza 5 cm lub/i kiedy klinicznie i histopatologicznie stwierdza się przerzuty do węzłów chłonnych łączące się w pakiety. W tych przypadkach celem poprawienia wyniku leczniczego, a nierzadko celem umożliwienia zabiegu operacyjnego stosuje się leczenie wstępne. Według licznych opracowań oraz trzech dużych badań klinicznych: NOAH, German Breast Group i MD. Anderson Cancer Center potwierdzono dużą skuteczność chemioterapii z dodatkiem trastuzumabu prowadzoną przez 6 miesięcy [31]. Uzyskano wyniki 37-65,2% - remisji całkowitych, która oznacza całkowitą patologiczną remisję. W niektórych badaniach dodatek trastuzumabu podwajał odsetek całkowitych remisji, w stosunku do leczenia wyłącznie chemicznego. American Cancer Society zaleca leczenie neoadiuwantowe przy zastosowaniu paklitakselu z trastuzumabem, a w dalszej kolejności 5-fluorouracylu z epirubicyną i następnie cyklofosfamidem z trastuzumabem.

Interesujące wyniki badania opisują Mittendorf i wsp., którzy grupę badaną - 143 chorych poddali leczeniu czterema cyklami paklitakselu, a następnie trzema cyklami opartym na antracyklinach i półrocznemu leczeniu trastuzumabem. 72 chorych czyli 50,3% uzyskało całkowitą remisję, częściową remisję stwierdzono u 61 chorych -

42,7%, a brak remisji u 7 pacjentów, co stanowiło 4,9%. W analizie histopatologicznej chorych z częściową remisją stwierdzono w 33% zmianę fenotypu raka na HER2(-). Badanie to sugeruje konieczność pooperacyjnego powtórznego badania histopatologicznego również w zakresie statusu receptorowego HER2 [16].

Leczenie zaawansowanego raka piersi. W przypadkach miejscowo zaawansowanego lub rozsiałego raka piersi HER2(+) zaleca się monoterapię lub leczenie skojarzone. Należy uwzględnić, że na tym etapie terapii częściej dochodzi do niepowodzenia prowadzonego leczenia. Stosowane są zazwyczaj schematy oparte na trastuzumabie w połączeniu z doksorubicyną, epirubicyną i cyklofosfamidem lub paklitaksellem [69]. Leczenie to wydłuża czas bez progresji. W rekomendacjach National Comprehensive Cancer Network (NCCN) sugerowane są schematy łączące trastuzumab z paklitaksellem, docetaksellem, winorelbina, analogami platyny i kapecytabiną [13]. Interesującym problemem jest podnoszona przez niektórych autorów sprawa zaprzestania podawania trastuzumabu w przypadku progresji choroby, która jest uwzględniona we wskazaniach ogólnych. Wielu autorów podkreśla skuteczność stosowania leku po wystąpieniu progresji, sugerując zmianę skojarzonego cytostatyku [16,44,50], obawiając się, że po jego odstawieniu mogłoby dojść do gwałtownego nawrotu choroby. Sugerują wielomechanizmowe działanie leku nie tylko przez jego zwykły szlak metaboliczny, ale również przez synergistyczny wpływ na działanie cytostatyków, chociaż nie ma to potwierdzenia w analizie badań retrospektywnych prowadzonych przez innych autorów [25].

Pojawiająca się oporność na trastuzumab, o jak dotąd niewyjaśnionej etiologii, jest często przyczyną zaprzestania leczenia. Kardiotoksyczność stanowi niejednokrotnie przeciwwskazanie do jego podania lub kontynuacji leczenia. W czasie leczenia trastuzumabem, jak i po jego zakończeniu należy monitorować czynność serca [48,69]. Mechanizm uszkodzenia mięśnia sercowego potęguje dysfunkcję spowodowaną przez antracykliny, których kardiotoksyczne działanie jest związane z wywołaniem stresu oksydacyjnego [39]. Efektem kardiotoksycznym trastuzumabu jest upośledzenie kurczliwości lewej komory serca obserwowane pod postacią zmniejszenia się frakcji wyrzutowej serca. W przypadku połączenia trastuzumabu z antracyklinami, które dodatkowo zaburzają przewodnictwo pod postacią zmian w elektrokardiogramie, arytmii, pogłębienia zaburzeń kurczliwości lewej komory oraz zapalenie mięśnia sercowego, obserwowany niekorzystny efekt jest synergistyczny. U podstaw zaburzeń leży zakłócenie przez trastuzumab szlaku sygnałowego w mięśniu sercowym, który jest zależny od HER2. Struktura miocytu pozwala utrzymać właściwe przewodnictwo mięśnia sercowego, jego budowę i funkcję polegającą na kurczliwości oraz chroni przed stresem oksydacyjnym. Uszkodzenie zależne od trastuzumabu polega na zmianie geometrii, a przez to funkcji, białek strukturalnych komórki mięśnia sercowego, co upośledza kurczliwość



Ryc. 2. Mechanizmy transportu cząsteczek

mięśnia. Uszkodzenie miocytów trastuzumabem sprawia, że stają się podatne na stres oksydacyjny wywołany przez antracykliny.

W obserwacjach klinicznych Seidman i wsp. stwierdzili objawowe zmniejszenie rzutu serca u 27% chorych, z których u 16% doszło do krytycznego uszkodzenia mięśnia sercowego III-IV w skali NYHA (New York Heart Association) przy jednoczesnym podawaniu doksorubicyny z trastuzumabem [63]. Uszkodzenie mięśnia sercowego objawia się podniesieniem stężenia troponiny w osoczu, co może być stosowane do jego monitorowania [17]. Uszkodzenie mięśnia sercowego przez samo leczenie trastuzumabem jest niezależne od dawki leku i pozostaje bezobjawowe zazwyczaj przez pierwsze 9 tygodni, co było punktem wyjścia do ustalenia harmonogramu badań kontrolnych [72]. Uszkodzenie miocytów spowodowane trastuzumabem jest w większości przypadków odwracalne i ustępuje stopniowo po zaprzestaniu leczenia. W badaniach Pereza i wsp. nad bezpieczeństwem stosowania chemioterapii w połączeniu z trastuzumabem w grupie 2992 chorych udowodniono, że po ustąpieniu objawów klinicznych upośledzenia kurczliwości lewej komory serca można było powrócić do leczenia trastuzumabem u 50% pacjentów [57]. Mimo to ponowne włączenie leku należy dokładnie rozważyć i przeanalizować, czy ryzyko nawrotu choroby przewyższa ryzyko ciężkiego uszkodzenia serca.

Obecnie w terapii anty-HER2 są stosowane inne preparaty pertuzumab i lapatinib; trwają obserwacje i badania nad ich skutecznością oraz niepożądanymi działaniami.

Lapatinib jest inhibitorem kinazy tyrozynowej receptora EGFR i receptora HER2/neu (ERBB-2) komórek nowotworowych. Może być kojarzony z kapecytabiną, letrozolem i trastuzumabem. Spowodowane przez niego powikłania kardiologiczne występują rzadziej niż w przypadku trastuzumabu i wynoszą 0,2-1,6% versus 0,4-3,8%. W przypadku tego chemioterapeutyku ważne są działania niepożądane dotyczące układu pokarmowego oraz zespół dłoniowo-podeszwy [39,57]. Humanizowane przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw receptorowi HER2 - pertuzumab - obecnie nie jest zarejestrowane w Polsce, mimo to może być stosowane z trastuzumabem lub docetakselem. Ciężkie uszkodzenie funkcji lewej komory podczas podawania pertuzumabu stosowanego bez trastuzumabu wynosi 3,2-5%, a zastosowanych łącznie około 16%. Częstość występowania gorączki neutropenicznej wynosi około 16% [42].

Zastosowanie przeciwciała monoklonalnego trastuzumab w terapii HER2(+) raków piersi przyniosło ogromny przełom w leczeniu tego źle rokującego raka. Ze względu na to, że rak dotyka zazwyczaj młodszych kobiet pożądanym efektem jest uzyskanie jak najdłuższego czasu przeżycia całkowitego i czasu do nawrotu choroby. Słabym punk-

tem terapii anty-HER2 z użyciem trastuzumabu są jego działania niepożądane. Uszkodzenie serca występujące wskutek leczenia trastuzumabem oraz jego potęgowanie przy stosowaniu innych preparatów ciągle ograniczają jego stosowanie oraz skłaniają do modyfikowania terapii opartych na trastuzumabie.

DENDRYMERY JAKO NOŚNIKI TRASTUZUMABU

Poszukiwanie skutecznego, nietoksycznego dla komórek prawidłowych i taniego leku przeciwnowotworowego wyznacza nowe kierunki badań w dziedzinie onkologii. Dobrze udokumentowane wyniki nad zastosowaniem dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych [27] w sposób naturalny kierują uwagę badaczy na zastosowanie dendrymerów jako ogniwa łączącego przeciwciało monoklonalne trastuzumab i leki przeciwnowotworowe. Ponieważ badania te dotyczą kilku ostatnich lat, nie ma wiele publikacji na ten temat.

Dendrymery to organiczne związki chemiczne o bardzo regularnej budowie, składające się z rdzenia oraz promieniście odchodzących gałęzi (dendronów). Ich fenomen polega na tym, że mogą transportować lek w dwojaki sposób: przez kowalencyjne związanie cząsteczek leku z grupami powierzchniowymi nanocząsteczki oraz ich enkapsulację w przestrzeniach między gałęziami polimeru [77]. Oprócz transportu leków przeciwnowotworowych te nanocząsteczki mogą przenosić wiele innych substancji, takich jak: znaczniki fluorescencyjne, fotouczulacze czy przeciwciała monoklonalne (ryc. 2).

Obecność dużej liczby grup funkcyjnych na powierzchni dendrymeru stwarza olbrzymie możliwości syntezy nie tylko koniugatów polimer-lek, ale również wiązania z powierzchnią dendrymeru innych cząsteczek mających bezpośredni wpływ na zwiększenie efektywności terapii i zminimalizowanie jej toksycznych skutków na komórki prawidłowe. Zachęcające są wyniki badań, w których do modyfikowania powierzchni dendrymeru zastosowano kwas foliowy. Modyfikacja ma na celu skuteczniejszy transport leku do komórki nowotworowej, ponieważ niektóre nowotwory, w tym rak jajnika, wykazują nadekspresję receptorów kwasu foliowego (FR, Folate Receptor) [40].

Konsekwencją postrzegania receptorów jako „wrót” prowadzących do wnętrza komórki i stosowania substancji działających na nie jak „klucz” jest zastosowanie przeciwciał. Utworzenie immunokoniugatów trastuzumab-dendrymer-lek ma kilka podstawowych, choć zdecydowanie ważnych zalet. Po pierwsze lek jest chroniony przed wcześniejszym uwalnianiem w układzie krwionośnym oraz zbyt szybką transformacją w wątrobie, w związku z tym istnieje możliwość ograniczenia dawki przy zachowaniu efektu terapeutycznego [5]. Po drugie, bezpośrednie uwalnianie substancji czynnej w środowisku guza pozwala uniknąć jej toksyczności na komórki prawidłowe, zwłaszcza kardiotoxyczności występującej u pacjentów po podaniu antracyklin oraz nefrotoksyczności wywoływanej taksanami stosowanymi w konwencjonalnej terapii no-

wotworów złośliwych. Zastosowanie koniugatu pozwala także uniknąć stosowania toksycznych rozpuszczalników oraz leków antyhistaminowych podawanych w czasie leczenia taksanami [2,14,73].

Obecność dokoniugowanego trastuzumabu do powierzchni dendrymeru (ryc. 3) związanego z lekiem umożliwia skuteczny transport substancji aktywnej do wnętrza komórki, co zostało potwierdzone przez zastosowanie koniugatów zmodyfikowanych powierzchniowo barwnikiem fluorescencyjnym.

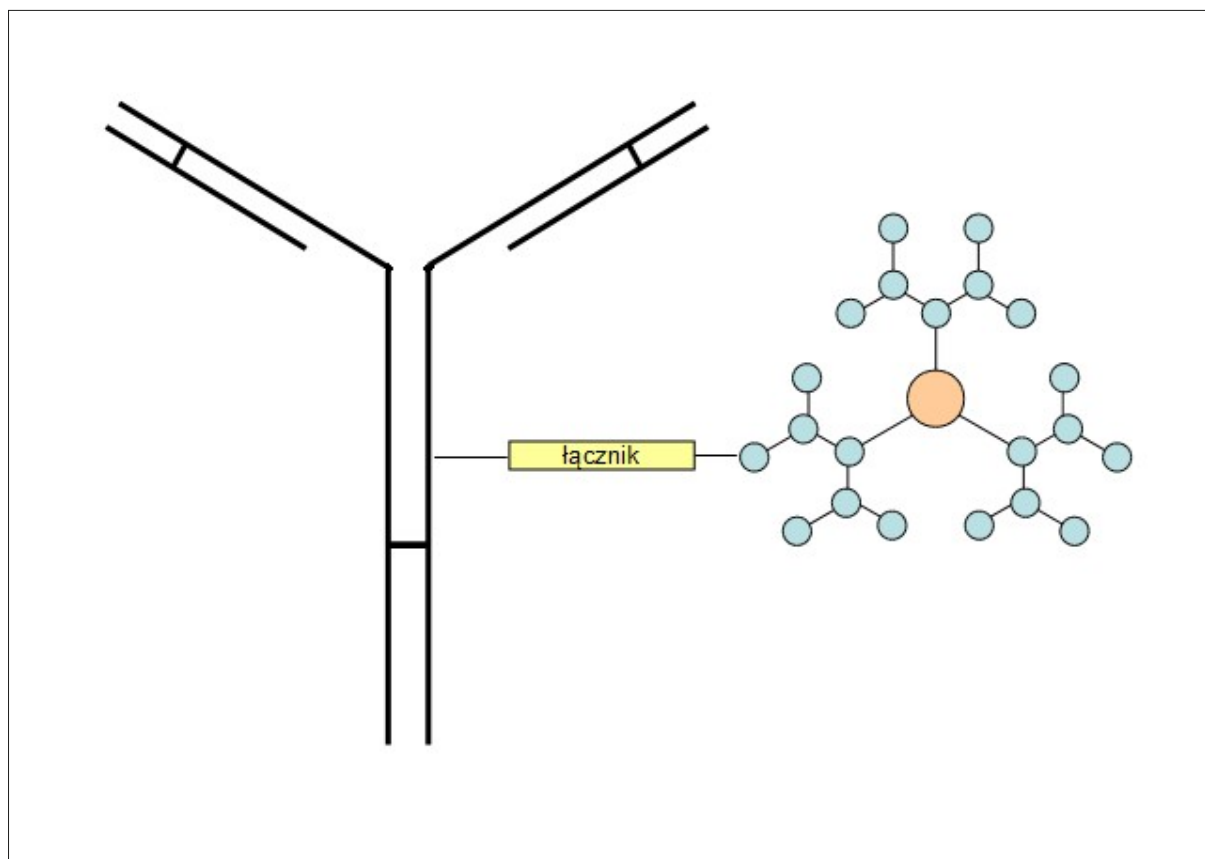
Skuteczność przeciwciała monoklonalnego skoniugowanego z dendrymerem potwierdziły badania *in vitro* Miyano i wsp. Wykorzystali dendrymery PAMAM generacji 6 modyfikowane powierzchniowo dwoma aminokwasami-lizyną i kwasem glutaminowym (KG6E). Do tak otrzymanych nanocząsteczek dokoniugowano trastuzumab oraz barwnik fluorescencyjny AlexaFlour 488. Badania z wykorzystaniem tego koniugatu były prowadzone na dwóch liniach komórkowych ludzkiego raka piersi: SK-BR3 (HER2-pozytywna) oraz MCF7 (HER2-negatywna). Wyniki potwierdziły skuteczność selektywnego wnikania koniugatu do komórek wykazujących nadekspresję receptora HER2. Ponadto udowodniono, że koniugat kumulował się w lizosomach, gdzie na skutek działania lizosomalnych enzymów oraz niskiego pH były uwalniane z nanocząsteczek leki przeciwnowotworowe [49].

Cline i wsp. przeprowadzili syntezę koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 5 zmodyfikowanego powierzchniowo paklitaksemem [22], natomiast Garea i wsp. skoniugowali z tym samym lekiem dendrymery PAMAM generacji 1,4 i 6 [30].

Inna wieloetapowa synteza wykonana przez Majorosa i wsp. doprowadziła do uzyskania koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 5 z paklitaksemem. Do cząsteczki dendrymeru została przyłączona fluoresceina (FITC, Fluorescein Isothiocyanate) oraz kwas foliowy pełniący funkcję wektora nakierowującego koniugat do komórek nowotworowych z nadekspresją receptora kwasu foliowego [43].

Równie interesujące okazały się wyniki badań zespołu Jamesa R. Bakera Jr., który zsyntezował koniugat dendrymeru PAMAM generacji 5 z trastuzumabem i metotreksatem - lekiem stosowanym w leczeniu m.in. raka skóry, płuc i piersi. Obserwowano zwiększone wnikanie koniugatu do komórki w porównaniu z wolnym lekiem. Toksyczność koniugatu względem komórek raka piersi linii MCA207-HER2 była jednak nieco mniejsza w porównaniu z wolnym metotreksatem. Przypisano to powolnemu uwalnianiu się metotreksatu z koniugatu oraz długiemu okresowi przebywania nanocząsteczki połączonej z lekiem w lizosomie [64].

Istotne jest to, aby lek przyłączony kowalencyjnie do nośnika był szybko i selektywnie dostarczany oraz uwalniany w środowisku guza. Koniugaty dendrymerów PAMAM generacji 4 spełniają swoją funkcję, co wykazano prowa-



Ryc. 3. Schemat budowy koniugatu trastuzumabu

dząc badania z koniugatem tego dendrymeru z dokсорubicyną. Lek z nanocząsteczką był związany za pomocą łącznika *cis*-akonitynowego (CAA, *Cis*-Aconitic Anhydride). Zaobserwowano, że tego typu pH-zależne wiązanie ulega hydrolizie, a lek zostaje uwolniony w otoczeniu guza, co umożliwia kontrolowane podanie określonej ilości substancji aktywnej w wybranym miejscu. Badania Pei i wsp. wykazały, że w zależności od stopnia PEGylacji koniugatu zachodzi w różnym stopniu jego kumulacja w komórkach nowotworowych. Badania były prowadzone na komórkach raka jajników (SKOV-3). Obecność koniugatu była obserwowana w lizosomach i późnych endosomach, a uwalniająca się dokсорubicyna akumulowała się w jądrze komórki nowotworowej [83]. Obserwowano również akumulację koniugatu w guzach w warunkach *in vivo*.

Badania Yabbarova i wsp. potwierdziły zależność uwalniania dokсорubicyny od zmniejszającego się pH. Zaobserwowano, iż w warunkach fizjologicznych (pH=7,4, t=37°C) po 24 godzinach inkubacji z koniugatem dendrymeru PAMAM generacji 2 i dokсорubicyny uwolniono zaledwie 8% leku. Wraz ze zmniejszającym się odczynem ilość uwalnianej substancji czynnej zwiększała się tak, że dla pH=6,0 wynosiła 50%, dla pH=5,5 - 90%, a dla pH=5,0 - 93% [82].

W ostatnich latach zaobserwowano skuteczność terapii antynowotworowej będącej wynikiem połączenia właściwości przeciwciał monoklonalnych i nuklidów promienio-

twórczych. Mechanizm niszczenia komórek nowotworowych z wykorzystaniem promieniowania jonizującego jest doskonale poznany, a jego zastosowanie leży u podstaw leczenia paliatywnego. Oprócz bezpośrednich skutków działania promieniowania jonizującego, np. pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA można zaobserwować także skutki pośrednie, będące wynikiem radiolizy wody, a co za tym idzie nadprodukcji reaktywnych form tlenu (ROS, Reactive Oxygen Species). Dlatego radioterapia, podobnie jak inne tradycyjne metody walki z rakiem, jest obarczona działaniami niepożądanymi. Zastosowanie odpowiednich nuklidów promieniotwórczych oraz dobór przenośników pozwala uniknąć m.in. choroby popromiennej oraz zwiększa skuteczność samej terapii. Zaobserwowano, że bardzo skuteczne jest połączenie izotopu promieniotwórczego z trastuzumabem. Radioimmunoterapię (RIT, Radioimmunotherapy) można podzielić na tradycyjną (conventional RIT) i tzw. „pretargeted RIT”. Tradycyjna radioimmunoterapia zakłada wprowadzenie do organizmu trastuzumabu związanego kowalencyjnie z izotopem [10]. „Pretargeted RIT” jest związana z dwoma etapami: w pierwszym dożylnie jest podawane zmodyfikowane przeciwciało monoklonalne. Po określonym czasie, gdy nastąpi jego maksymalna akumulacja w okolicy guza wykonuje się dożylny wlew zawierający substancję promieniotwórczą. Udowodniono, że radioaktywny izotop łączy się kowalencyjnie z przeciwciałem po dostaniu się do komórek guza. Taka dwuetapowa metoda pozwala na zwiększenie skuteczności

leczenia, gdyż podawane substancje promieniotwórcze, o małej masie molowej (w porównaniu z przeciwciałem) znacznie szybciej docierają w okolice guza, niż te kowalencyjnie związane z trastuzumabem [61].

Inną modyfikacją tradycyjnej radioimmunoterapii jest wykorzystanie nanocząsteczek. Zespół naukowców z Uniwersytetu w Toronto przeprowadził badania, których celem było porównanie znakowanego izotopem indu- ^{111}In koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 4 i trastuzumabu połączonego z pierwiastkiem promieniotwórczym. Zarówno koniugat jak i samo przeciwciało zostały uprzednio wzbogacone w sekwencję NLS (Nuclear Translocation Sequence) – peptyd zawierający duży procent aminokwasów kationowych. Niska energia izotopu ^{111}In (poniżej 25 keV) oraz bardzo wysoki LET (Linear Energy Transfer) pozwala na transfer energii na odległości nano- i mikrometrów. Z tego powodu jest to stosunkowo bezpieczna metoda chroniąca pacjentów przed skutkami napromieniowania zdrowych tkanek. Ponadto rozpad indu w okolicy guza jest związany z emisją promieniowania β^- , co wpływa negatywnie na komórki nowotworowe, powodując pęknięcia dwuniciowe (DSBs, Double-Strand Breaks) prowadzące do śmierci komórki w wyniku apoptozy. Wpływ promieniotwórczego koniugatu trastuzumabu z dendrymerem oraz radioaktywnego przeciwciała badano na dwóch liniach

komórkowych raka piersi. Zaobserwowano, że koniugat dendrymeru i przeciwciała wykazywał 2-4 razy większą aktywność wobec komórek SK-BR3 oraz 9 razy wobec komórek MDA-MB-231 niż samo przeciwciało połączone z pierwiastkiem promieniotwórczym [18].

PODSUMOWANIE

Prowadzone badania jednoznacznie wskazują, iż użycie koniugatów nie tylko zwiększa skuteczność leczenia, ale również zmniejsza toksyczność terapeutyków względem komórek prawidłowych. Zastosowanie połączenia trastuzumabu, dendrymeru i leków pozwala na uzyskanie efektu terapii celowanej oraz dostarczenie bezpośrednio do komórek nowotworowych wysokiej dawki leku, przy jednoczesnej rezygnacji z dotychczas stosowanych toksycznych rozpuszczalników. Koniugaty są interesującą propozycją mogącą przynieść poprawę skuteczności terapii najczęściej występującego nowotworu u kobiet, jakim jest nowotwór piersi. Jednak aby zastosować je w przyszłości w terapii przeciwnowotworowej niezbędne jest jeszcze wykonanie wielu badań.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękujemy Dominice Wróbel za wykonanie rycin do pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Albanell J., Codony J., Rovira A., Mellado B., Gascon P.: Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003; 532: 253-268
- [2] Alexis F., Rhee J.W., Richie J.P., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C.: New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.*, 2008; 26: 74-85
- [3] Arpino G., Weiss H., Lee A.V., Schiff R., De Placido S., Osborne C.K., Elledge R.M.: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005; 97: 1254-1261
- [4] Barok M., Tanner M., Könink K., Jorma I.: Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab resistant breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Res.*, 2011; 13: R46
- [5] Barratt G.M.: Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2000; 3: 163-171
- [6] Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim Y.M., Mendelsohn J.: Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/*neu* overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 1998; 58: 2825-2831
- [7] Beano A., Signorino E., Evangelista A., Brusa D., Mistrangelo M., Polimeni M.A., Spadi R., Donadio M., Ciuffreda L., Matera L.: Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J. Transl. Med.*, 2008; 6: 25
- [8] Bishop J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983; 52: 301-354
- [9] Blanco M.D., Teijón C., Olmo R.M., Teijón J.M.: Targeted nanoparticles for cancer therapy. W: *Recent advances in novel drug carrier systems*. 2012; 241-277
- [10] Boerman O.C., van Schaijk F.G., Oyen W.J., Corstens F.H.: Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J. Nucl. Med.*, 2003; 44: 400-411
- [11] Borg A., Tandon A.K., Sigurdsson H., Clark G.M., Fernö M., Fuqua S.A., Killander D., McGuire W.L.: HER-2/*neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.*, 1990; 50: 4332-4337
- [12] Bublil E.M., Yarden Y.: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2007; 19: 124-134
- [13] Burstein H.J., Keshaviah A., Baron A.D., Hart R.D., Lambert-Falls R., Marcom P.K., Gelman R., Winer E.P.: Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer*, 2007; 110: 965-972
- [14] Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L.: Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008; 60: 1615-1626
- [15] Cadoo K.A., Fournier M.N., Morris P.G.: Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013; 57: 312-321
- [16] Canello G., Montagna E., D'Agostino D., Giuliano M., Giordano A., Di Lorenzo G., Plaitano M., De Placido S., De Laurentiis M.: Continuing trastuzumab beyond disease progression: outcomes analysis in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2008; 10: R60
- [17] Cardinale D., Colombo A., Torrisi R., Sandri M.T., Civelli M., Salvatici M., Lamantia G., Colombo N., Cortinovis S., Dessanai M.A., Nolè F., Veglia F., Cipolla C.M.: Trastuzumab-induced cardiotoxicity: clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 3910-3916

- [18] Chan C., Cai Z., Reilly R.M.: Trastuzumab labeled to high specific activity with ^{111}In by conjugation to G4 PAMAM dendrimers derivatized with multiple DTPA chelators exhibits increased cytotoxic potency on HER2-positive breast cancer cells. *Pharm. Res.*, 2013; 30: 1999-2009
- [19] Charliński G., Boguradzki P.: Zastosowanie trastuzumabu w leczeniu guzów litych. *Współcz. Onkol.*, 2003; 7: 39-44
- [20] Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney D.W.Jr., Leahy D.J.: Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 2003; 421: 756-760
- [21] Clark A.S., West K., Streicher S., Dennis P.A.: Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 707-717
- [22] Cline E.N., Li M.H., Choi S.K., Herbstman J.F., Kaul N., Meyhöfer E., Skiniotis G., Baker J.R., Larson R.G., Walter N.G.: Supporting information for: paclitaxel-conjugated PAMAM dendrimers adversely affect microtubule structure through two independent modes of action. University of Michigan, Ann Arbor, MI48109: S1-S12
- [23] Cohen S., Carpenter G., King L.Jr.: Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 4834-4842
- [24] Colbern G.T., Hiller A.J., Musterer R.S., Working P.K., Henderson I.C.: Antitumor activity of Herceptin® in combination with STEALTH® liposomal cisplatin or nonliposomal cisplatin in a HER2 positive human breast cancer model. *J. Inorg. Biochem.*, 1999; 77: 117-120
- [25] Dębska S., Potemski P.: Kontynuowanie leczenia trastuzumabem po progresji u chorych na raka piersi - argumenty za i przeciw. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2009; 5: 189-197
- [26] El-Sahwi K., Bellone S., Cocco E., Cargnelutti M., Casagrande F., Bellone M., Abu-Khalaf M., Buza N., Tavassoli F.A., Hui P., Silasi D.A., Azodi M., Schwartz P.E., Rutherford T.J., Pecorelli S., Santin A.D.: *In vitro* activity of pertuzumab in combination with trastuzumab in uterine serous papillary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 134-143
- [27] Esfand R., Tomalia D.A.: Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today*, 2001; 6: 427-436
- [28] Fountzilias G., Tsavdaridis D., Kalogera-Fountzila A., Christodoulou C.H., Timotheadou E., Kalofonos C.H., Kosmidis P., Adamou A., Papakostas P., Gogas H., Stathopoulos G., Razis E., Bafaloukos D., Skarlos D.: Weekly paclitaxel as first-line chemotherapy and trastuzumab in patients with advanced breast cancer. A Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study. *Ann. Oncol.*, 2001; 12: 1545-1551
- [29] Fuchs I., Vorsteher N., Buhler H., Evers K., Sehouli J., Schaller G., Kümmel S.: The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. *Anticancer Res.*, 2007; 27: 959-963
- [30] Garea S.A., Ghebaure A.: FT-IR spectroscopy and thermogravimetric characterization of prodrugs based on different dendritic polymers and antitumoral drug. *Mater. Plast.*, 2012; 49: 1-4
- [31] Gianni L., Eiermann W., Semiglazov V., Lluch A., Tjulandin S., Zambetti M., Moliterni A., Vazquez F., Byakhov M.J., Lichinitser M., Climent M.A., Ciruelos E., Ojeda B., Mansutti M., Bozhok A., et al.: Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.*, 2014; 15: 640-647
- [32] Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J.; Panel members.: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.*, 2013; 24: 2206-2223
- [33] Huang J., Wang S., Lyu H., Cai B., Yang X., Wang J., Liu B.: The anti-erbB3 antibody MM-121/SAR256212 in combination with trastuzumab exerts potent antitumor activity against trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer*, 2013; 12: 134
- [34] Hudis C.A.: Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 357: 39-51
- [35] Hurrell T., Outhoff K.: The *in vitro* influences of epidermal growth factor and heregulin- β 1 on the efficacy of trastuzumab used in Her-2 positive breast adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.*, 2013; 13: 97
- [36] Jackson S.E., Chester J.D.: Personalised cancer medicine. *Int. J. Cancer*, 2015; 137: 262-266
- [37] Kim J.W., Kim Y.T., Kim D.K., Song C.H., Lee J.W.: Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.*, 1996; 60: 283-287
- [38] Kobayashi H., Wu C., Kim M.K., Paik C.H., Carrasquillo J.A., Brechbiel M.W.: Evaluation of the *in vivo* biodistribution of indium-111 and yttrium-88 labeled dendrimer-1B4M-DTPA and its conjugation with anti-Tac monoclonal antibody. *Bioconjug. Chem.*, 1999; 10: 103-111
- [39] Kroep J.R., Linn S.C., Boven E., Bloemendal H.J., Baas J., Mandjes I.A., van den Bosch J., Smit W.M., de Graaf H., Schröder C.P., Vermeulen G.J., Hop W.C., Nortier J.W.: Lapatinib: clinical benefit in patients with HER2-positive advanced breast cancer. *Neth. J. Med.*, 2010; 68: 371-376
- [40] Kukowska-Latallo J.F., Candido K.A., Cao Z., Nigavekar S.S., Majoros I.J., Thomas T.P., Balogh L.P., Khan M.K., Baker J.R.Jr.: Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 5317-5324
- [41] Kunisue H., Kurebayashi J., Otsuki T., Tang C.K., Kurosumi M., Yamamoto S., Tanaka K., Doihara H., Shimizu N., Sonoo H.: Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br. J. Cancer*, 2000; 82: 46-51
- [42] Lamond N.W., Younis T.: Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations. *Int. J. Womens Health*, 2014; 6: 509-521
- [43] Majoros I.J., Myc A., Thomas T., Mehta C.B., Baker J.R.Jr.: PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 572-579
- [44] Mannocci A., De Feo E., de Waure C., Specchia M.L., Gualano M.R., Barone C., Ricciardi W., La Torre G.: Use of trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer beyond disease progression: a systematic review of published studies. *Tumori*, 2010; 96: 385-391
- [45] Margolis B.L., Lax I., Kris R., Dombalagian M., Honegger A.M., Howk R., Givol D., Ullrich A., Schlessinger J.: All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/*neu* are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 10667-10671
- [46] Mendelsohn J.: The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001; 8: 3-9
- [47] Merlin J.L., Barberi-Heyob M., Bachmann N.: *In vitro* comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann. Oncol.*, 2002; 13: 1743-1748
- [48] Milani A., Sangiolo D., Montemurro F., Aglietta M., Valabrega G.: Active immunotherapy in HER2 overexpressing breast cancer: current status and future perspectives. *Ann Oncol.*, 2013; 24: 1740-1748
- [49] Miyano T., Wijagkanalan W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M.: Anionic amino acid dendrimer-trastuzumab conjugates for specific internalization in HER2-positive cancer cells. *Mol. Pharm.*, 2010; 7: 1318-1327
- [50] Montemurro F., Donadio M., Clavarezza M., Redana S., Jacomuzzi M.E., Valabrega G., Danese S., Vietti-Ramus G., Durando A., Venturini M., Aglietta M.: Outcome of patients with HER2-positive advanced bre-

ast cancer progressing during trastuzumab-based therapy. *Oncologist*, 2006; 11: 318-324

[51] Mrozowski M., Olszewski W.P., Piaszcik A., Olszewski W.T.: HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results. *Pol. J. Pathol.*, 2004; 55: 165-171

[52] Nahta R., Esteva F.J.: HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 5078-5084

[53] Nishimura R., Okumura Y., Arima N.: Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer: time to progression and survival. *Breast Cancer*, 2008; 15: 57-64

[54] Olson E.M., Najita J.S., Sohl J., Arnaout A., Burstein H.J., Winer E.P., Lin N.U.: Clinical outcomes and treatment practice patterns of patients with HER2-positive metastatic breast cancer in the post-trastuzumab era. *Breast*, 2013; 22: 525-531

[55] Park J.W., Colbern G., Nuijens A.: Increased levels of circulating HER2 ECD in response to anti-HER2 antibody therapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1997; 46: 267

[56] Pegram M., Hsu S., Lewis G., Pietras R., Beryt M., Sliwkowski M., Coombs D., Baly D., Kabbinnar F., Slamon D.: Inhibitory effects of combinations of HER-2/*neu* antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene*, 1999; 18: 2241-2251

[57] Perez E.A., Suman V.J., Davidson N.E., Sledge G.W., Kaufman P.A., Hudis C.A., Martino S., Gralow J.R., Dakhlil S.R., Ingle J.N., Winer E.P., Gelmon K.A., Gersh B.J., Jaffe A.S., Rodeheffer R.J.: Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 1231-1238

[58] Ritter C.A., Arteaga C.L.: The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Semin. Oncol.*, 2003; 30 (Suppl. 1): 3-11

[59] Ropero S., Menéndez J.A., Vázquez-Martín A., Montero S., Cortés-Funes H., Colomer R.: Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004; 86: 125-137

[60] Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Pusztai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N.: The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 2009; 14: 320-368

[61] Rossin R., Verkerk P.R., van den Bosch S.M., Volders R.C., Verel I., Lub J., Robillard M.S.: *In vivo* chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010; 49: 3375-3378

[62] Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J.S., Hortobagyi G.N., Pusztai L.: Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 5678-5685

[63] Seidman A., Hudis C., Pierri M.K., Shak S., Paton V., Ashby M., Murphy M., Stewart S.J., Keefe D.: Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1215-1221

[64] Shukla R., Thomas T.P., Desai A.M., Kotlyar A., Park S.J., Baker J.R.: HER2 specific delivery of methotrexate by dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Nanotechnology*, 2008; 19: 295102

[65] Simon R., Nocito A., Hübscher T., Bucher C., Torhorst J., Schraml P., Bubendorf L., Mihatsch M.M., Moch H., Wilber K., Schötzau A., Kononen J., Sauter G.: Patterns of HER-2/*neu* amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 1141-1146

[66] Singletary S.E., Allred C., Ashley P., Bassett L.W., Berry D., Bland K.I., Borgen P.I., Clark G., Edge S.B., Hayes D.F., Hughes L.L., Hutter R.V., Morrow M., Page D.L., Recht A., et al.: Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 3628-3636

[67] Sjögren S., Inganäs M., Lindgren A., Holmberg L., Bergh J.: Prognostic and predictive value of *c-erbB-2* overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 462-469

[68] Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science*, 1987; 235: 177-182

[69] Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 783-792

[70] Sosińska-Melcarek K., Jassem J.: Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2005; 1: 225-232

[71] Stemmler H.J., Mengele K., Schmitt M., Harbeck N., Laessig D., Herrmann K.A., Schaffer P., Heinemann V.: Intrathecal trastuzumab (Herceptin) and methotrexate for meningeal carcinomatosis in HER2-overexpressing metastatic breast cancer: a case report. *Anticancer Drugs*, 2008; 19: 832-836

[72] Suter T.M., Procter M., van Veldhuisen D.J., Muscholl M., Bergh J., Carlomagno C., Perren T., Passalacqua R., Bighin C., Klijn J.G., Ageev F.T., Hitre E., Groetz J., Iwata H., Knap M., et al.: Trastuzumab-associated cardiac adverse effects in the herceptin adjuvant trial. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 3859-3865

[73] Talekar M., Kendall J., Denny W., Garg S.: Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. *Anticancer Drugs*, 2011; 22: 949-962

[74] Tang Y., Lamberti G., Curran E., Kiani M., Wang B.: Development and characterization of a multi-drug resistant Her-2/*neu* positive breast cancer cell line (58.6). *FASEB J.*, 2014; 28 (Suppl.): 58.6

[75] Taucher S., Rudas M., Mader R.M., Gnant M., Dubsky P., Bachleitner T., Roka S., Fitzal F., Kandioler D., Sporn E., Friedl J., Mittlböck M., Jakesz R.: Do we need HER-2/*neu* testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer*, 2003; 98: 2547-2553

[76] Treish I., Schwartz R., Lindley C.: Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2000; 57: 2063-2076

[77] Tripathy S., Das M.K.: Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers. *J. Appl. Pharmaceut. Sci*, 2013; 3: 142-149

[78] Tseng P.H., Wang Y.C., Weng S.C., Weng J.R., Chen C.S., Brueggemeier R.W., Shapiro C.L., Chen C.Y., Dunn S.E., Pollak M., Chen C.S.: Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol. Pharmacol.*, 2006; 70: 1534-1541

[79] Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., Stewart S.J.: First-line Herceptin® monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology*, 2001; 61 (Suppl. 2): 37-42

[80] Witters L.M., Kumar R., Chinchilli V.M., Lipton A.: Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-*neu* antibody. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1997; 42: 1-5

[81] Wu C., Brechbiel M.W., Kozak R.W., Gansow O.A.: Metal-chelate-dendrimer-antibody constructs for use in radioimmunotherapy and imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994; 4: 449-454

[82] Yabbarov N.G., Posypanova G.A., Vorontsov E.A., Popova O.N., Severin E.S.: Targeted delivery of doxorubicin: drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry*, 2013; 78: 884-894

[83] Zhu S., Hong M., Zhang L., Tang G., Jiang Y., Pei Y.: PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: *in vitro* evaluation and *in vivo* tumor accumulation. *Pharm. Res.*, 2010; 27: 161-174

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

28.08.2019

mgr Monika Marcinkowska

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Przeciwciała monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 45%.

Monika Marcinkowska

28.08.2019

dr n. med. Maciej Stańczyk

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika

ul. Pabianicka 62

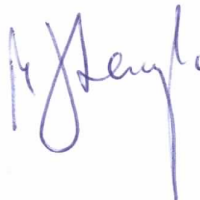
93-513 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Przeciwciała monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 40%.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Stańczyk', is located below the text of the declaration.

28.08.2019

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz

Katedra Biofizyki Ogólnej UŁ

ul. Pomorska 141/143

90-236 Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem artykułu naukowego pt. „Przeciwciała monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi” autorstwa Moniki Marcinkowskiej, Macieja Stańczyka, Barbary Klajnert-Maculewicz.

Mój wkład w powstanie niniejszego artykułu polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i przygotowaniu części publikacji.

Mój wkład oceniam na 15%.

B. Klajnert-Maculewicz