

Koniugaty nanoprętów złota z Affibody w terapii fotothermalnej celowanej w komórki raka HER2– dodatniego

mgr inż. Maria Cristina Nevarez Martinez

STRESZCZENIE

Jednym z obecnych wyzwań na świecie jest potrzeba opracowania mniej inwazyjnych i bardziej selektywnych narzędzi do teranostyki nowotworów. W ostatnich terapiach celowanych wykorzystano wysoki poziom ekspresji receptora ludzkiego czynnika wzrostu naskórka typu 2 (HER2), który został skorelowany z niekorzystnym rokowaniem i wczesnymi nawrotami po operacji u pacjentów z nowotworami HER2-pozytywnymi. Jednocześnie, wybrane nanomateriały okazały się skuteczne jako czynniki fototermiczne, ze względu na zdolność do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych poprzez hipertermię. Nadal konieczne jest jednak zwiększenie ich selektywności, a także skuteczności w terapii celowanej. W niniejszej pracy zaprojektowano ukierunkowany na HER2 system oparty na nanoprętach złota, połączonych z cząsteczkami Affibody specyficznymi dla HER2, $Z_{HER2:2891}$.

Nanopręty złota (Au NRs) zostały otrzymane z wykorzystaniem metody wzrostu z zarodków (ang. *seed-growth*), następnie poddane PEGyłowaniu za pomocą metoksypolietylenoglikolu z przyłączoną grupą tiolową (mPEG-SH) i skoniugowane z otrzymanymi na drodze syntezy chemicznej cząsteczkami Affibody zmodyfikowanymi cysteiną (Affi), wiążącymi się do receptora HER2. Systematyczne badania otrzymywania nanoprętów (NR) wykazały, że prędkość mieszania podczas przygotowywania zarodków (800–1500 obr/min), czyli aspekt często pomijany, jest istotna dla osiągnięcia powtarzalności syntezy NR. W kolejnym etapie opracowano optymalne warunki PEGylacji i osadzenia Affi na powierzchni nanoprętów, którymi okazały się być: 0,1 M bufor fosforanowy (PB), pH 6 oraz stosunek molowy 0,1:1 mPEG-SH lub Affi do nanoprętów

złota pokrytych bromkiem cetylotrimetyloamoniowym (CTAB-Au NRs) lub PEGyloowanych (PEG-Au NRs). W każdym przypadku początkowa liczba nanoprętów złota (Au NR) została ustalona na poziomie 500 nmol w przeliczeniu na Au⁰, co zostało oznaczone spektrofotometrycznie przez pomiar absorpcji przy 400 nm. Z drugiej strony, silne powinowactwo wiązania zsyntetyzowanego Affi do HER2 zostało wyznaczone za pomocą termoforezy mikroskalowej (MST, $K_D = 29,7 \pm 3,8$ nM) i potwierdzone z wykorzystaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej (FFC).

Internalizacja PEGyloowanych nanoprętów złota z dołączonym Affi (Affi-Au NRs) została potwierdzona za pomocą odbiciowej mikroskopii konfokalnej, nanopręty Affi-Au zostały zlokalizowane w cytoplazmie komórek HER2-pozytywnych. Biokoniugaty nie wykazywały działania cytotoksycznego wobec komórek SKOV-3, MDA-MB-468, ani zdrowych komórek HEK293T. Jednocześnie terapia fototermalna przy dawce energii świetlnej 367 J cm⁻² (408 mW cm⁻², 15 min) i 100 μM Affi-Au NRs (w przeliczeniu na Au⁰), wykazała specyficzną cytotoksyczność wobec komórek SKOV-3 z 85% ($p < 0,01$) spadkiem przeżywalności i wyraźnymi zmianami morfologii tych komórek. Terapia nie wpłynęła natomiast negatywnie na komórki HEK293T. Powyższe analizy *in vitro* stanowią obiecujące badania wstępne, otwierające perspektywy do dalszych badań nad dawką światła, stężeniem nanomateriałów i optymalizacją ich powierzchni. Skuteczność terapii zachęca do kontynuacji badań w kierunku jej możliwego zastosowania *in vivo*.