

# Grawimetryczna charakterystyka koniugatu: kropki kwantowe - cząsteczka naprowadzająca - lek przeciwnowotworowy

ALEKSANDRA RĘBIŚ

Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod  
Promotor: dr Agata Kowalczyk

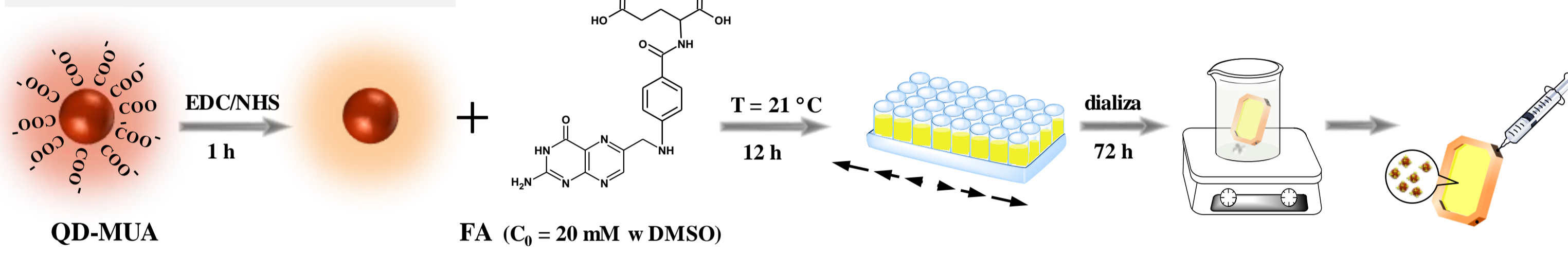
## WSTĘP I CEL PRACY

W celu zminimalizowania skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowych oraz maksymalnego wykorzystania możliwości terapeutycznych leków opracowuje się specjalne systemy ich biodystrybucji, tzw. nośniki leków. Zwiększają one rozmiar leku, znacznie ograniczając jego dyfuzję do prawidłowych komórek. Najbardziej efektywnym sposobem zwiększenia rozmiaru leku jest zastosowanie systemów kontrolowanego dostarczania leków, czyli utworzenie koniugatu nośnik-lek.

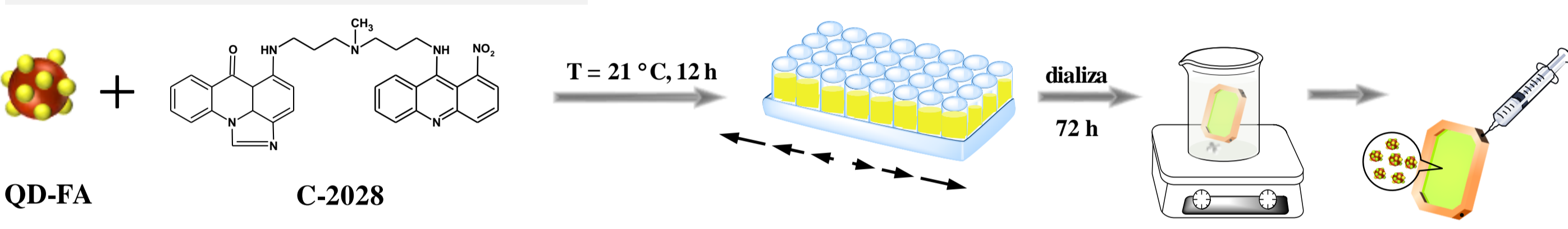
Celem niniejszej pracy magisterskiej była synteza i fizykochemiczna charakterystyka koniugatu kropka kwantowa - cząsteczka naprowadzająca - związek o właściwościach przeciwnowotworowych. W badaniach wykorzystano czterostopowe kropki kwantowe AgInZnS zmodyfikowane kwasem 11-merkaptoundekanowym (synteza dr hab. P. Bujak, prof. ucz. WCh PW). W roli związku przeciwnowotworowego zastosowano związek C-2028 (synteza prof. dr hab. Z. Mazerska i dr hab. E. Augustin, prof. ucz. WCh PG). Funkcję cząsteczki naprowadzającej pełnił kwas foliowy (FA). Zsyntezowany koniugat scharakteryzowano ilościowo (określono jego rozmiar, wartość ładunku powierzchniowego, ilość wprowadzonego FA i związku C-2028) oraz określono szlak jego pozakomórkowej degradacji.

## PROCEDURA SYNTAZY KONIUGATU

### ETAP 1: Synteza nośnika QD-FA



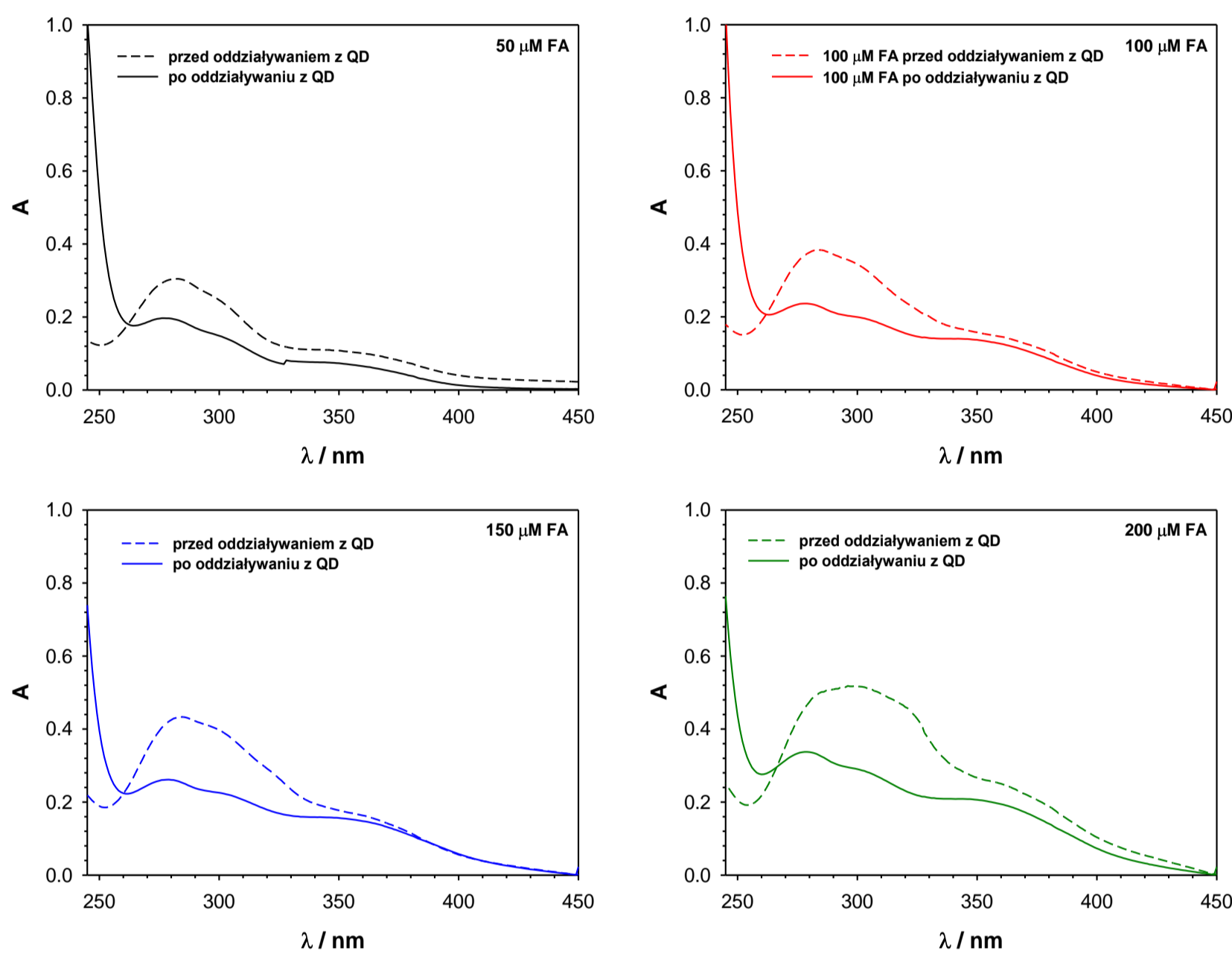
### ETAP 2: Synteza koniugatu QD-FA-C-2028



W etapie I do zaaktywowanych kropek kwantowych dodano wodne roztwory FA o stężeniach 50, 100, 150 i 200  $\mu M$ , umieszczono na 12 h w termomikserze, a następnie przez 72 h prowadzono dializę w celu odmycia nieprzereagowanych cząsteczek kwasu foliowego. W etapie II do nośnika QD-FA przyłączono lek C-2028 (głównie na drodze adsorpcji fizycznej). Powtórzono etap mieszania w termomikserze i dializy analogicznie do etapu I.

## SYNTEZA QD-FA: WYNIKI UV-VIS

Aby potwierdzić skuteczność zastosowanej procedury syntezy nośnika QD-FA zarejestrowano widma UV-Vis roztworu kwasu foliowego przed i po jego oddziaływaniu z kropkami kwantowymi. Spadek absorpcji potwierdza wiązanie kwasu foliowego z powierzchnią kropki kwantowej. Z kolei dane z pomiarów grawimetrycznych wykorzystano do obliczenia stężenia powierzchniowego FA ( $\Gamma_{QCM-D}$ ).

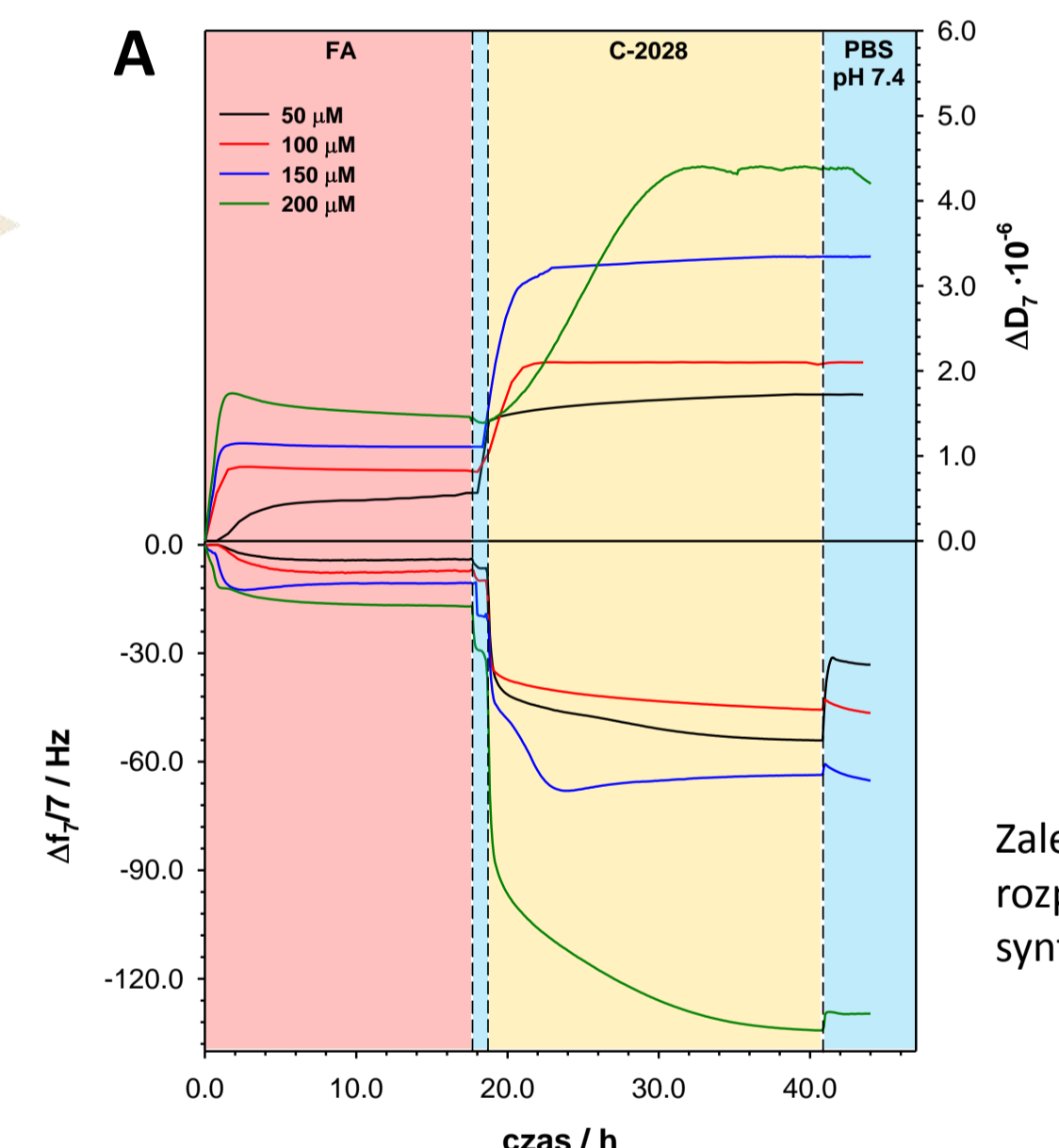


Dla roztworu FA o stężeniu 200  $\mu M$  uzyskano 4-krotnie większe  $\Gamma_{FA}$  niż dla stężenia 50  $\mu M$ .

	$\Gamma_{QCM-D}$ [nmol·cm <sup>-2</sup> ]
50 $\mu M$ FA	0.148
100 $\mu M$ FA	0.297
150 $\mu M$ FA	0.429
200 $\mu M$ FA	0.694

Widma UV-vis zarejestrowane dla różnych stężeń FA przed i po oddziaływaniu z QD.

## SYNTEZA QD-FA-C-2028: WYNIKI QCM-D

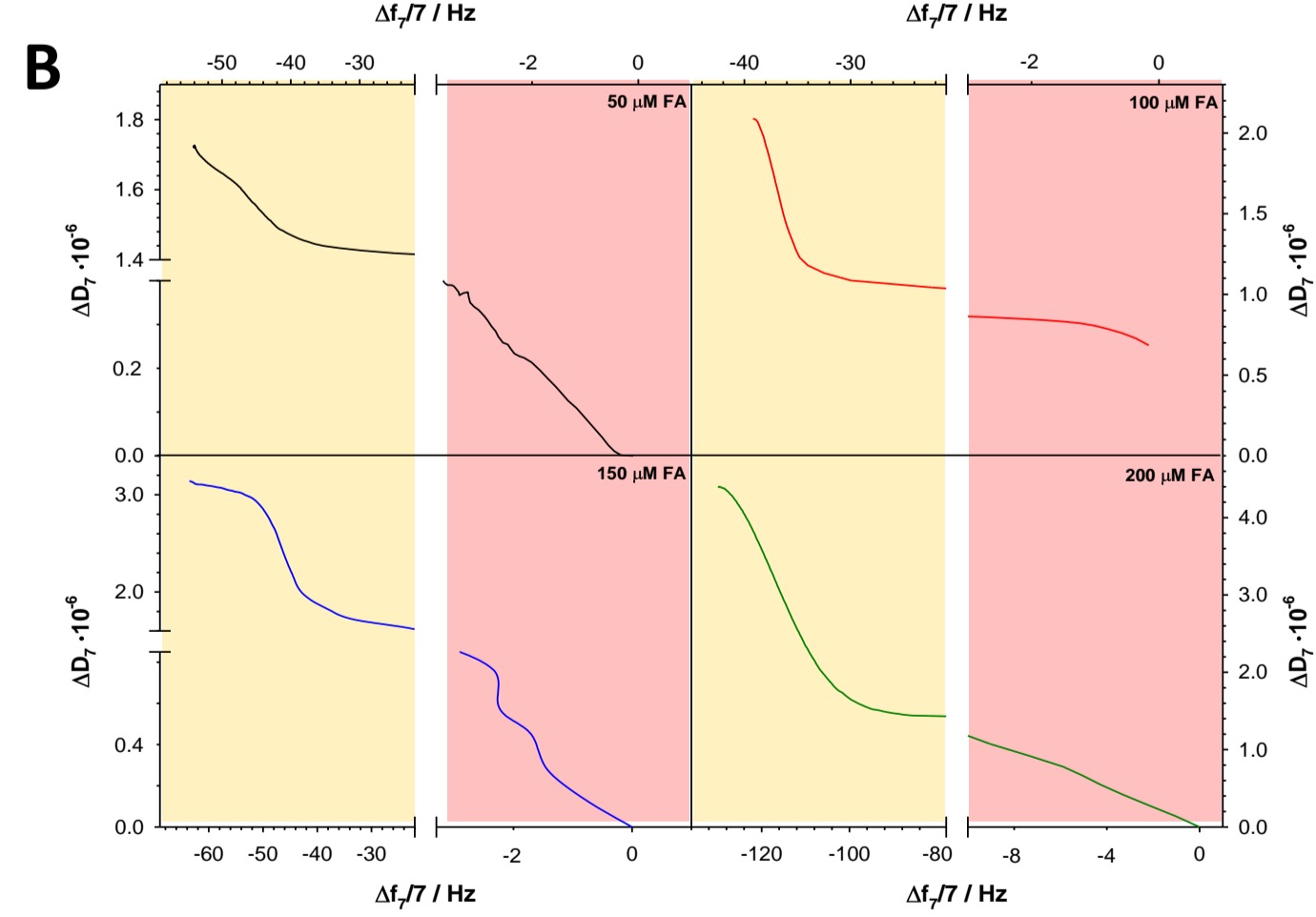


Wprowadzenie do naczynka pomiarowego roztworu kwasu foliowego skutkowało spadkiem częstotliwości drgań kryształu kwarcu (im większe stężenie FA tym większy spadek częstotliwości drgań). Dodanie związku przeciwnowotworowego C-2028 powodowało dalszy spadek częstotliwości drgań kryształu kwarcu.

Zależności zmian częstotliwości drgań kryształu kwarcu ( $\Delta f$ ) i współczynnika rozproszenia energii ( $\Delta D$ ) zarejestrowane podczas poszczególnych etapów syntezy koniugatu QD-FA-C-2028.

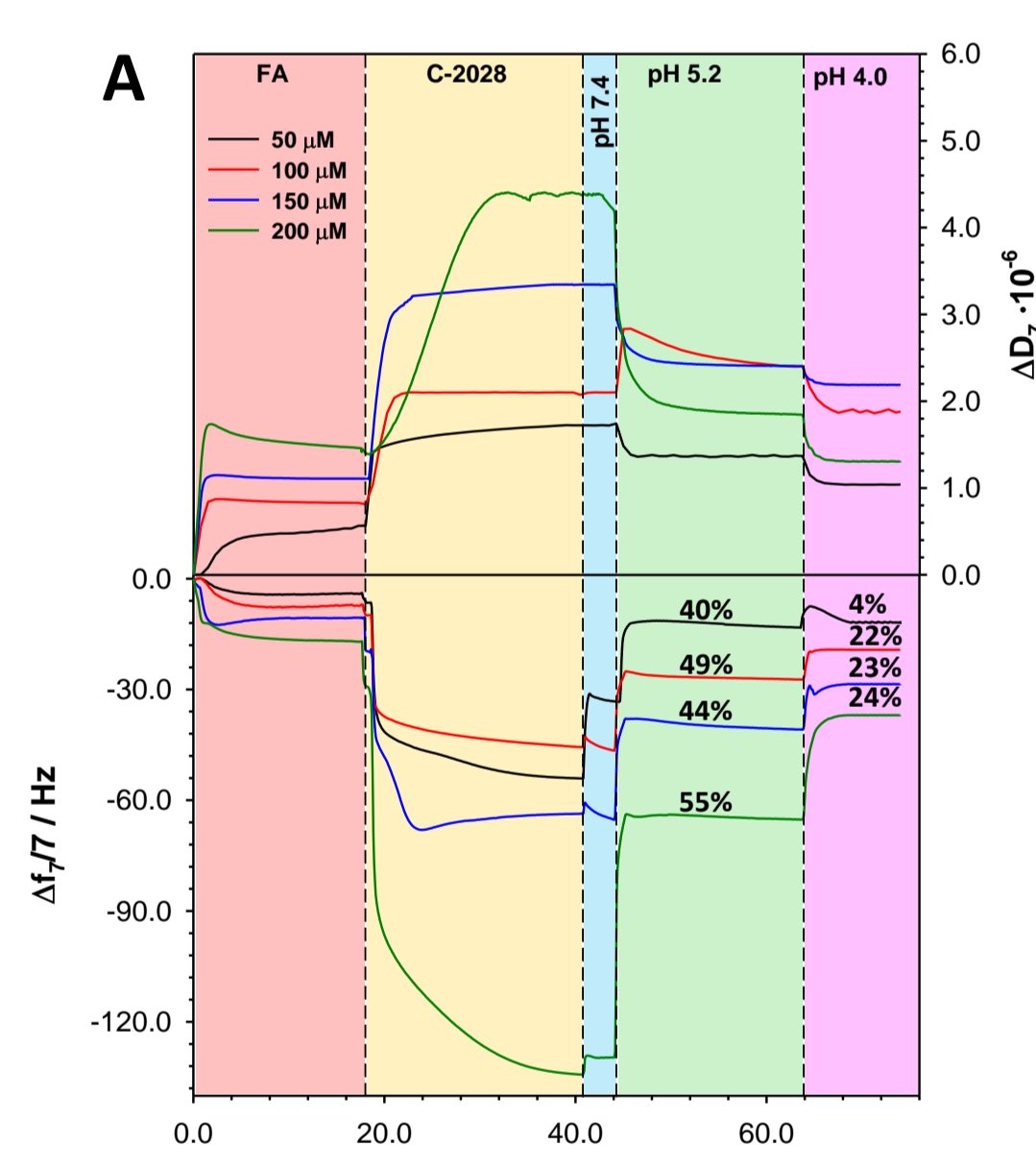
Wykreślenie zależności zmian współczynnika dyssypacji w funkcji zmian częstotliwości drgań kryształu kwarcu pozwoliło uzyskać informacje na temat orientacji cząsteczek w warstwie. Najbardziej zróżnicowaną orientację cząsteczek FA uzyskano dla 150  $\mu M$  kwasu foliowego (zakresy o różnym nachyleniu krzywej), dla pozostałych stężeń przeważa jednakowa orientacja cząsteczek FA.

W przypadku warstwy C-2028 dla każdego stężenia FA widoczne są dwa zakresy liniowości świadczące o różnej orientacji i oddziaływaniach między cząsteczkami leku. Bisakrydyny wykazują silną tendencję do tworzenia dimerów, co jest dobrze widoczne na wykresie w postaci dwóch zakresów liniowości.



Zależność zmian  $\Delta D$  w funkcji  $\Delta f$  dla etapów syntezy koniugatów QD-FA i QD-FA-C-2028.

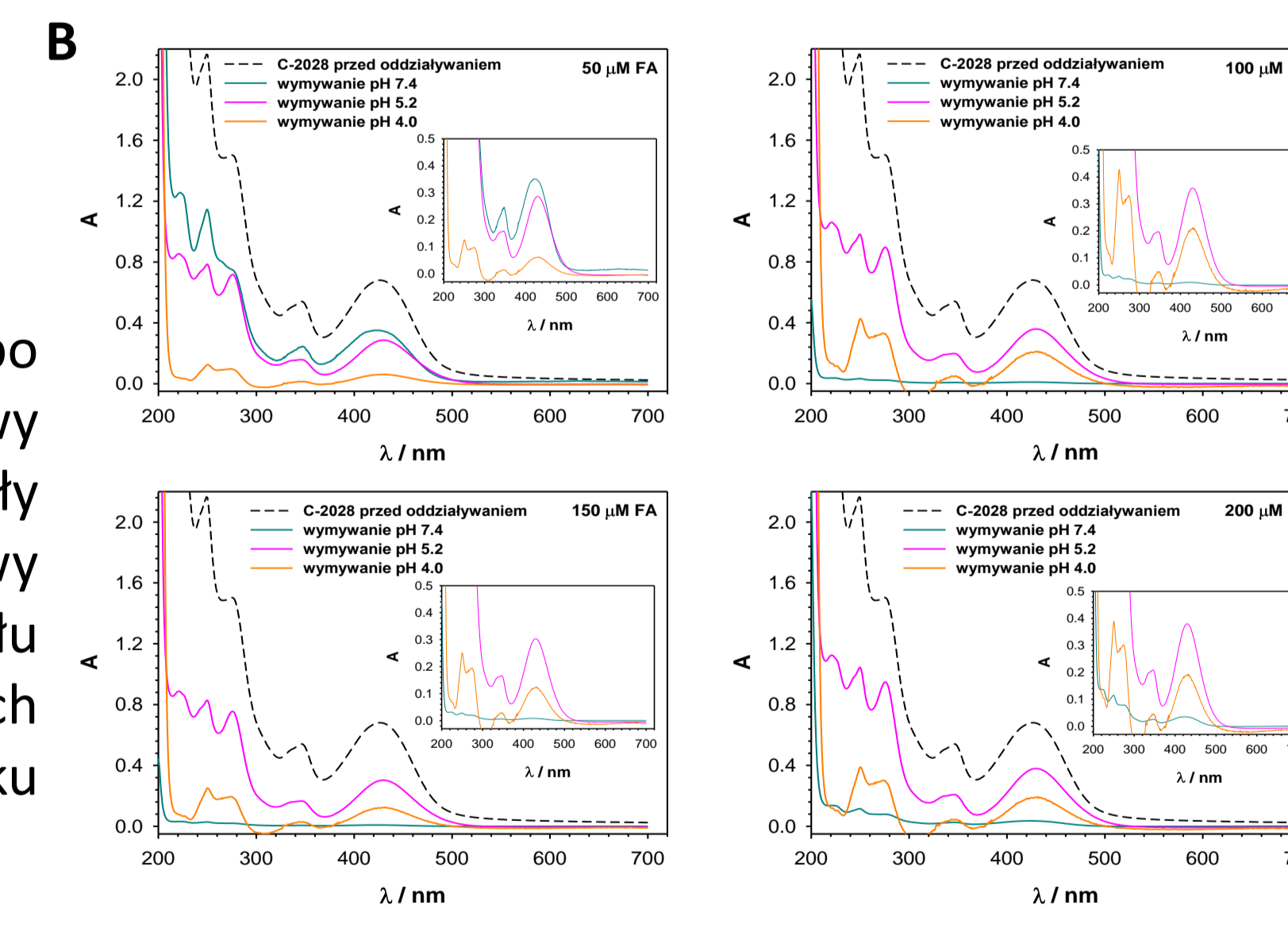
## OKREŚLENIE SZLAKU UWALNIANIA C-2028 Z KONIUGATU



Zależności zmian częstotliwości drgań kryształu kwarcu ( $\Delta f$ ) i współczynnika rozproszenia energii ( $\Delta D$ ) zarejestrowane podczas poszczególnych etapów syntezy koniugatu QD-FA-C-2028 i jego trwałości w różnym pH.

Widma UV-vis zarejestrowane przed i po przepuszczeniu przez układ pomiarowy buforów kolejno pH: 7.4, 5.2 i 4.0 potwierdziły wymywanie związku C-2028 z warstwy koniugatu utworzonej na powierzchni kryształu kwarcu. Spadek absorpcji na widmach związany jest z zmniejszającą się ilością związku C-2028 w warstwie.

Koniugaty nośnik-lek rozpuszczone w płynie zewnątrzkomórkowym mogą być transportowane za pośrednictwem endocytozy. Poszczególnym fazom endocytozy towarzyszy obniżenie pH. Aby określić szlak pozakomórkowej degradacji koniugatu wykonano eksperymenty z użyciem buforu o pH 5.2 (endosom), oraz pH 4.0 (lizosom). Badania grawimetryczne wykazały, że koniugat o najmniejszej zawartości FA charakteryzował się najmniejszą stabilnością (już w pH 7.4 nastąpiło odmycie ok. 40% związku C-2028). Obniżenie pH do 5.2 powoduje uwalnianie kolejnej partii związku C-2028 na poziomie około 50% bez względu na ilość FA. Dalsze obniżenie pH powoduje uwalnianie kolejnej partii związku C-2028 na poziomie około 20% w stosunku do ilości wprowadzonej.



Widma UV-vis roztworów o różnym pH uzyskanych na etapie wymywania.

## PODSUMOWANIE

Badania DLS i zeta potencjału wykazały, że ilość wprowadzonego związku przeciwnowotworowego koreluje z ilością FA na powierzchni kropki kwantowej, a monodispersyjność koniugatu QD-FA-C-2028 rośnie ze wzrostem ilości wprowadzonego FA. Na podstawie badań QCM-D zaobserwowano, że związek C-2028 uwalniany jest z koniugatu częściowo na szlaku endosomotropowym i częściowo na szlaku lizosomotropowym. Zarejestrowane widma UV-vis potwierdziły wiązanie kwasu foliowego z powierzchnią kropek kwantowych, a także wymywanie związku przeciwnowotworowego C-2028. Wstępne badania cytotoksyczności potwierdziły brak negatywnego działania związku przeciwnowotworowego C-2028 w formie koniugatu na komórki prawidłowe.

## WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE BADANYCH KONIUGATÓW

W celu potwierdzenia skuteczności syntezy i trwałości uzyskanych koniugatów wykonano pomiary DLS i zeta potencjału. Z postępem syntezy obserwowano wzrost wielkości cząstek oraz spadek wartości współczynnika PDI (zwiększanie monodispersyjności warstw). Wartość potencjału zeta powyżej wartości 25 mV świadczy o wysokiej stabilności koniugatu, a znak potencjału mówi o ładunku zgromadzonym na powierzchni.

POTENCJAŁ ZETA				
QD-MUA	-34.1 mV			
QD-FA	-39.2 mV	-41.3 mV	-44.5 mV	-46.7 mV
QD-FA-C-2028	-27.0 mV	-20.1 mV	-18.4 mV	-16.7 mV

