

## Apoferitin: nanotransportér pro cílené dopravování léčiv

Dita Münzová<sup>a</sup>, Simona Dostálová<sup>b,c</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>c,d</sup>, René Kizek<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Gymnázium Brno-Řečkovice, Terezy Novákové 2, 621 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Ústav biomedicínského inženýrství, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, Antonínská 1, 602 00 Brno, Česká republika

<sup>c</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>d</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Apoferitin: nanocarrier for targeted drug delivery

Routine cancer treatment often causes damage to whole human organism, because cytostatic drugs, which are used during the treatment and whose function is to stop growth of cancer cells, affect also healthy cells and untargeted tissues. Due to this fact, nanocarriers and targeted drug delivery have been recently studied. Side effects and organ damage can be reduced by using nanocarriers and targeted drug delivery.

The aim of this assay was to monitor and characterize apoferitin as a nanocarrier for targeted drug delivery. In this work the surface of nanocarrier composed of apoferitin with encapsulated doxorubicin was modified with gold nanoparticles or chloroauric acid, conjugated with linker (HWR peptide) because of correct binding of the antibody and labeled with specific antibody. In this assay the resulting nanocarrier was studied with gel electrophoresis and fluorescent methods.

**Přijato k publikování:** 21. 2. 2014

**Číslo slova:** apoferitin; cílené dopravování léčiv; doxorubicin; nanomedicína; nanotransportér; teranostika

### Úvod

Rakovina je skupina nádorových onemocnění při kterých dochází k nekontrolovatelnému růstu a množení buněk, které ztrácí schopnost apoptózy<sup>1</sup>. Aktuálně používané metody léčby, jako je chemoterapie, radioterapie nebo chirurgická léčba, nejsou dostačující co se týče efektivity a počtu vyléčených pacientů<sup>2</sup>. To je způsobeno i používáním cytostatických léčiv, které zastavují růst buněk, a to jak rakovinných, tak i zdravých, což způsobuje mnoho vedlejších účinků doprovázejících léčbu<sup>3</sup>. Mezi nejčastěji používaná cytostatická léčiva patří anthracyklinové antibiotikum doxorubicin, poškozující myokard, čímž zhoršuje srdeční činnost<sup>3</sup>. Z těchto důvodů se v poslední době přikládá velká pozornost studiu nanotransportérů a cílenému dopravování léčiv<sup>4</sup>. Jako nanotransportéry mohou být použity zlaté nanočástice<sup>5</sup>, lipozomy<sup>6,7</sup>, kvantové tečky<sup>8</sup> nebo proteiny, jako je apoferitin.

Cílené dopravování léčiv pomocí nanotransportérů je založeno na enkapsulaci cytostatického léčiva do dutiny nanotransportéru nebo navázání léčiva na jeho povrch<sup>9</sup>. Povrch nanotransportéru může být následně modifikován specifickým druhem protilátky, díky které se nanotransportéry dostanou na místo urče-

ní, kde je po změně podmínek (změna pH, teploty) léčivo uvolněno<sup>3</sup>. Tím dochází ke snížení vedlejších účinků a působení léčiva pouze na nádorové buňky. Kromě cíleného dopravování léčiv vznikají další nové možnosti aplikací nanočástic jako použití při diagnostickém zobrazování<sup>10,11</sup>. Kombinace diagnostického zobrazování a cíleného transportu formuje nový, perspektivní obor nanomedicíny<sup>4</sup>, teranostiku<sup>12,13</sup>.

Při pouhé modifikaci povrchu nanotransportéru protilátkami vzniká stericky nejednoznačný komplex, tudíž není zajištěno, že cílová protilátka bude navázána přes Fc region a její aktivní část správně geometricky orientována k vnějším antigenům. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá modifikací povrchu a navázáním různých komponent na nanotransportér, prokázáním jejich vazby a důkazem selektivního cílení navrženého nanotransportéru na nádorové buňky.

Základem navrženého nanotransportéru byl protein apoferitin s enkapsulovaným anthracyklinovým antibiotikem doxorubicinem, který byl do apoferitinu uzavřen na základě změny pH. Další složkou nanotransportéru byly zlaté nanočástice, HWR peptid a specifická cílová protilátka. HWR peptid (HWR-GWVC) byl vyroben v naší laboratoři a je odvozen

od proteinu G, který má schopnost vázat protilátky prostřednictvím interakce s Fc regionem, což zaručuje správnou orientaci protilátky k vnějším antigenům<sup>14</sup>.

## Experimentální část

### Chemikálie

Všechny použité chemikálie v ACS čistotě byly dodány firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. Doxorubicin hydrochlorid byl pořízen v HPLC kvalitě od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu

200  $\mu$ l doxorubicinu (DOX) o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno k 20  $\mu$ l apoferritinu (APO) z koňské sleziny o koncentraci 50 mg/ml a ke 100  $\mu$ l vody. Dále bylo přidáno 2,5  $\mu$ l 1M kyseliny chlorovodíkové, za účelem snížení pH a otevření APO. Následně byl roztok míchán po dobu 15 minut. Posléze bylo přidáno 2,5  $\mu$ l hydroxidu sodného k opětovnému zvýšení pH a enkapsulaci DOX do dutiny APO (vznik komplexu APODOX). Směs byla ponechána po dobu 15 minut při teplotě 20 °C a pak dvakrát promyta vodou přes kolonky Amicon® Ultra -0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

### Modifikace APODOX zlatem

Povrch komplexu APODOX byl modifikován zlatými nanočásticemi. Příprava zlatých nanočástic probíhala podle následujícího postupu: 0,25 ml citronanu sodného o koncentraci 26,5 g/l bylo smícháno s 10 ml 1 mM kyseliny tetrachlorozlatité a třepáno po dobu 1 hodiny při teplotě 20 °C. Průměrná výsledná velikost vzniklých zlatých nanočástic byla 1,4 nm, což bylo změřeno na přístroji Zetasizer Nano Z (Malvern, Anglie). K APODOX bylo přidáno 25  $\mu$ l 1mM zlatých nanočástic (následováno 3 mg NaBH<sub>4</sub> a pozorován vývoj vodíku) a tato směs byla třepána na přístroji Orbital Shaker (Biosan, Riga, Lo) při teplotě 20 °C po dobu 12 hodin. Výsledný produkt byl šestkrát promyt vodou přes kolonky Amicon® Ultra -0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

### ELISA

Mikrotitrační destička MaxiSorp Nunclon byla pokryta kozími anti-IgG protilátkami, slepičími IgY protilátkami a lidskými IgG protilátkami, které byly naředěny uhličitanovým pufrem na koncentraci 2  $\mu$ g/ml, v objemu 50  $\mu$ l na jamku. Následně byla

mikrotitrační destička zakryta fólií a umístěna do 37 °C po dobu 2 hodin pro navázání protilátek na povrch jamky. Po uplynutí 2 hodin byly přebytečné molekuly z každé jamky odsáty a bylo přidáno 50  $\mu$ l 1 % BSA (hovězí sérový albumin) v PBS (fosfátový pufr) pro zablokování povrchu jamek. Blokace probíhala 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po zablokování povrchu byly jamky promyty 50  $\mu$ l PBS-T.

Ve zkumavkách byly konjugovány APODOX a APODOX modifikovaný zlatými nanočásticemi (APODOX-Nano) a kyselinou tetrachlorozlatitou (HAu) s HWR peptidem. Objem vzorku byl vždy 250  $\mu$ l, 125  $\mu$ l APODOX a 125  $\mu$ l HWR peptidu o koncentraci 5  $\mu$ g/ml. Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 20 nebo 45 °C a třepání 400 rpm. Po inkubaci byly vzorky dialyzovány podle návodu výrobce přes Amicon® Ultra -0.5 ml 3K při teplotě 20 °C, po dobu 15 minut a 6000 rpm. Filtrát byl doplněn do objemu 250  $\mu$ l a změřeno absorpční spektrum 230 až 600 nm na UV transparentní destičce v Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko).

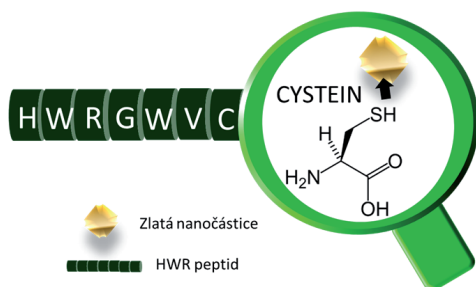
Objem vzorků byl doplněn na 250  $\mu$ l a bylo změněno emisní spektrum při excitaci 480 nm a emisí 515 – 850 nm v Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Ke vzorkům bylo přidáno 0,5  $\mu$ l IgG o koncentraci 14  $\mu$ g/ml. Dále byly vzorky umístěny na rotátor Multi RS-60 (Biosan, Lotyšsko) po dobu 1 hodiny při teplotě 20 °C a třepání 600 rpm.

Po uplynutí 1 hodiny bylo vždy 50  $\mu$ l vzorku napipetováno do MaxiSorp Nunclon mikrotitrační destičky s navázanými protilátkami. Následně proběhla inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C a po jejím uplynutí bylo změřeno emisní spektrum při excitaci 480 nm a emisí 515 – 850 nm v Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Po změření emisního spektra byly vzorky promyty 50  $\mu$ l PBS a opět změřeny. Nakonec byly přidány 2  $\mu$ l 1M HCl, aby došlo ke snížení pH a otevření APODOX, a znovu změřeno emisní spektrum.

## Výsledky a diskuse

### Modifikace povrchu zlatými nanočásticemi

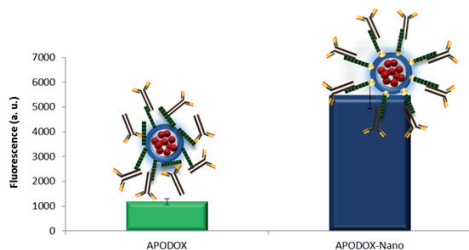
Povrch nanotransportéru byl modifikován zlatými nanočásticemi, z toho důvodu že zlato má vysokou afinitu k SH skupinám cysteinu na konci HWR peptidu (*Obr. 1*), který byl další komponentou ve struktuře nanotransportéru.



**Obr. 1:** Afinita zlata k SH skupinám cysteinu

V tomto experimentu byl sledován vliv modifikace zlatými nanočásticemi na množství navázaného nanotransportéru na povrch jamky pokryté protilátkami proti cílíci protilátce na povrchu nanotransportéru. Byla použita metoda na způsob ELISA testu, kdy bylo dno mikrotitrační destičky pokryto kozími anti-lidskými-IgG protilátkami a následně nanesen nanotransportér s lidskými IgG protilátkami a proběhla inkubace.

Byly zkoumány dva druhy APODOX, a to APODOX bez zlatých nanočástic s HWR peptidem a cílíci protilátkou a APODOX se zlatými nanočásticemi, HWR peptidem a cílíci protilátkou.



**Obr. 2:** Vliv modifikace zlatými nanočásticemi

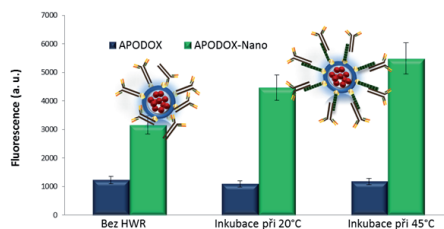
Obr. 2 ukazuje, že v případě APODOX se zlatými nanočásticemi byl zaznamenán vyšší fluorescenční signál než u samotného APODOX. To je důkazem toho že díky zlatým nanočásticím došlo k navázání HWR peptidu a z toho důvodu mohlo dojít k navázání většího množství správně orientované cílíci protilátky a zároveň celkově většího množství nanotransportéru na kozí anti-lidské-IgG protilátky na dně jamky.

### Vliv použití HWR peptidu

Další navázanou komponentou na nanotransportér byl HWR peptid, který díky histidinu na aminovém

konci své struktury má schopnost vázat všechny podtřídy HIgG a hovězí, myši, kozi a králíčí IgG prostřednictvím interakce s jejich Fc regionem.

V tomto experimentu byl sledován vliv použití HWR peptidu na množství navázaného nanotransportéru na povrch jamky. Opět byla použita metoda na způsob ELISA testu. Byly porovnávány dva vzorky APODOX, z nichž jeden ve své struktuře obsahoval HWR peptid, přičemž ostatní komponenty zůstaly nezměněny (zlaté nanočástice, cílíci protilátka). Dalším zkoumaným parametrem byla teplota, při které HWR peptid interagoval se zlatými nanočásticemi, a to buď při 20 °C, nebo 45 °C. Následně bylo provedeno fluorescenční měření.



**Obr. 3:** Vliv použití HWR peptidu

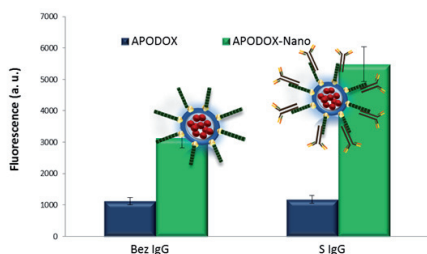
Obr. 3 ukazuje, že v případě APODOX s HWR peptidem byl zaznamenán vyšší signál než u APODOX bez HWR peptidu, což je důkazem toho, že díky HWR peptidu, byla navázaná správně orientovaná cílíci protilátka, která zapříčinila větší množství navázaného nanotransportéru na povrch jamky. Bez použití HWR peptidu nedošlo k vazbě protilátky přes Fc region, tudíž nebyla správně orientována aktivním místem k vnějším antigenům, v tomto případě je tedy zaznamenán nejnižší signál. U samotného APODOX bez modifikace zlatými nanočásticemi nebyla žádná změna signálu zaznamenána v závislosti na přítomnosti HWR peptidu, znamená to, že nezáleží na použití dalších komponent v případě, že povrch není modifikován zlatými nanočásticemi.

Na základě získaných výsledků je optimální teplota inkubace HWR peptidu se zlatými nanočásticemi je 45 °C. Tento experiment dokazuje, že HWR peptid příznivě ovlivňuje geometrii celého komplexu.

### Vliv přítomnosti IgG protilátky

Další komponentou, která byla součástí nanotransportéru byla lidská IgG protilátka, jejímž prostřed-

nictvím došlo k navázání z vnější na antigen. Tento experiment byl zaměřen na sledování množství navázaného nanotransportéru v závislosti na použití IgG protilátky. Byl proveden opět metodou na způsob ELISA testu, stejně jako předchozí experimenty.

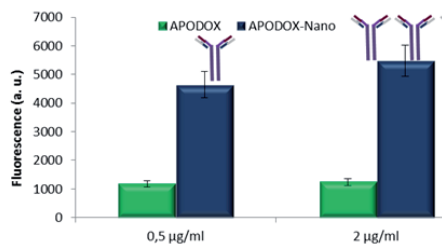


**Obr. 4:** Vliv použití IgG protilátky

Obr. 4 ukazuje, že v případě APODOX modifikovaného zlatými nanočásticemi byl po interakci s lidskou IgG protilátkou zaznamenán vyšší signál, zatímco u samotného APODOX bez zlatých nanočástic nedošlo k žádné změně. Tento experiment dokazuje specifitu APODOX modifikovaného zlatými nanočásticemi.

#### Vliv koncentrace antigenu

V následujícím experimentu byl sledován vliv koncentrace kozích anti-IgG protilátky na povrchu jamky na množství navázaného nanotransportéru. Byla použita metoda na způsob ELISA testu, stejně jako u předchozích experimentů. Byl sledován APODOX a APODOX se zlatými nanočásticemi, na které byly vždy navázány HWR peptid a lidské IgG protilátky. Kozí anti-lidské-IgG protilátky o koncentracích 0,5 µg/ml a 2 µg/ml byly použity pro modifikaci povrchu jamky.



**Obr. 5:** Vliv koncentrace anti-IgG protilátky

Obr. 5 ukazuje, že v případě APODOX modifikovaného zlatými nanočásticemi došlo po zvýšení koncentrace anti-IgG protilátky k navýšení signálu, zatímco signál u samotného APODOX zůstal stejný. Na samotný APODOX nemá koncentrace protilátek žádný vliv. To, že signál APODOX modifikovaného zlatými nanočásticemi po navýšení koncentrace protilátek vzrostl, ukazuje na specifitu vazby protilátek, pokud je IgG protilátka na povrchu nanotransportéru vhodně geometricky orientována svým aktivním místem k vnějším antigenům (anti-IgG protilátka).

#### Závěr

Provedenými experimenty bylo potvrzeno navázání všech komponent na nanotransportér a také získán důkaz o nutnosti přítomnosti všech komponent nanotransportéru. Vytvořený nanotransportér je schopen selektivně cílit libovolné buňky, jejichž typ je závislý pouze na použitém druhu protilátky proti povrchovým antigenům daného typu buněk.

*Tato práce byla financována ze zdrojů CYTORES GA ČR P301/10/0356.*

#### Literatura

1. Ferrari M.: Nature Reviews Cancer, 5, 161 (2005).
2. Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: Pharmacological Research, 62, 144 (2010).
3. Drbohlavova J., Chomoucka J., Adam V., Ryvolova M., Eckschlagler T., Hubalek J., Kizek R.: Current Drug Metabolism, 14, 547 (2013).
4. Kawasaki E. S., Player A.: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 1, 101 (2005).
5. Patra C. R., Bhattacharya R., Mukhopadhyay D., Mukherjee P.: Advanced Drug Delivery Reviews, 62, 346 (2010).
6. Hu Y. R., Li K., Wang L., Yin S. S., Zhang Z. Z., Zhang Y.: Journal of Controlled Release, 144, 75 (2010).
7. Malam Y., Loizidou M., Seifalian A. M.: Trends in Pharmacological Sciences, 30, 592 (2009).
8. Marchal F., Pic E., Pons T., Dubertret B., Bolotine L., Guillemin F.: Bulletin Du Cancer, 95, 1149 (2008).
9. Mishra B., Patel B. B., Tiwari S.: Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine, 6, 9 (2010).
10. Gu F. X., Karnik R., Wang A. Z., Alexis F., Levy-Nissenbaum E., Hong S., Langer R. S., Farokhzad O. C.: Nano Today, 2, 14 (2007).
11. Wang J. Q., Sui M. H., Fan W. M.: Current Drug Metabolism, 11, 129 (2010).
12. Sumer B., Gao J. M.: Nanomedicine, 3, 137 (2008).
13. Svenson S.: Molecular Pharmaceutics, 10, 848 (2013).
14. Janu L., Stanisavljevic M., Krizkova S., Sobrova P., Vaculovicova M., Kizek R., Adam V.: Electrophoresis, 34, 2725 (2013).



Článek je volně šiřitelný  
pod licencí Creative  
Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit  
a používat pro komerční účely.