

Emilia Teresa Majka

Pegylowane nanocząstki złota pokryte radionuklidami $^{197m/197}\text{Hg}$ - nowe podejście do terapii elektronami Auger potrójnie ujemnego nowotworu piersi i glejaka wielopostaciowego

STRESZCZENIE

Nowotwory pozbawione specyficznej ekspresji receptora stanowią poważne wyzwanie dla projektowania nowych radiofarmaceutyków. Tego rodzaju raki charakteryzują się niską przeżywalnością i wysoką przerzutowością. Przerzutowy potrójnie ujemny rak piersi opiera się leczeniu konwencjonalnemu oraz ma wskaźnik śmiertelności na poziomie 88%,¹ podobnie jak glejak wielopostaciowy, którego wskaźnik śmiertelności wynosi 93%.² W przypadku obu tych nowotworów istnieje jednak możliwość zastosowania brachyterapii. Z tego względu, w niniejszej rozprawie zdecydowano się na przeprowadzenie badań na liniach komórkowych wywodzących się z tych nowotworów, a dzięki zastosowaniu nanocząstek złota (AuNPs) jako nośników radionuklidów, koncepcję tę poszerzono o możliwość zastosowania badanych związków do nanobrachyterapii.

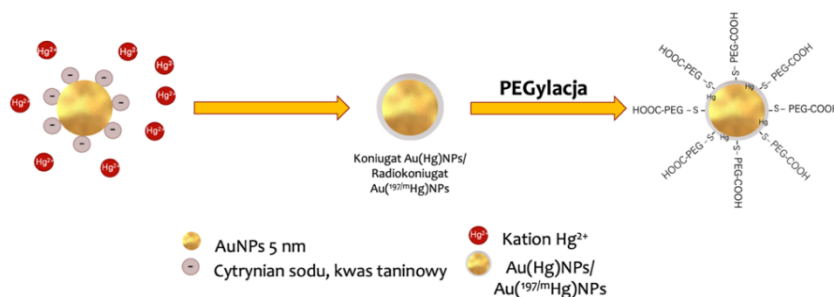
Nanobrachyterapia jest metodą, która umożliwia bezpośrednie podanie leku do guza, bez konieczności ukierunkowania na specyficzne receptory. Wykorzystując radionuklidy emitujące elektrony Augera, które charakteryzują się wysokim wskaźnikiem liniowego transferu energii, umożliwiającym indukcję dwuniciowych pęknięć DNA, można skutecznie zwiększyć efektywność nanobrachyterapii, na przykład poprzez połączenie $^{197m/197}\text{Hg}$ z nanocząstkami złota.

W niniejszej pracy do pokrycia nanocząstek złota zastosowane zostały radionuklidy rtęci ^{197m}Hg ($T_{1/2}=23,8$ h, $E_\gamma=134$ keV, 34%) i ^{197}Hg ($T_{1/2}=64,14$ h, $E_\gamma=77$ keV, 19% i 279 keV, 6%). Radionuklidy te są emiterami elektronów Auger (AE) i konwersji (CE). Podczas rozpadu ^{197m}Hg emitowane jest 19,4 AE o średniej energii 0,7 keV/AE i 1,6 CE o średniej energii 127,0 keV/CE. Podczas rozpadu ^{197}Hg emitowane jest 23,2 AE o średniej energii 0,7 keV/AE i 0,8 IC o średniej energii 67,0 keV/CE.³

Opisany w rozdziale pierwszym cel pracy obejmuje syntezę, charakteryzację oraz badania biologiczne koniugatu Au(Hg)NPs-PEG, a także jego radioaktywnego odpowiednika - radiokoniugatu Au($^{197m/197}\text{Hg}$)NPs-PEG. W pracy przedstawiona została również synteza oraz analiza synergicznego działania terapeutycznego radiokoniugatu $^{198}\text{Au}({}^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, który posiada w swojej strukturze zarówno izotop beta promieniotwórczy (^{198}Au) jak i emitery elektronów Auger (^{197m}Hg i ^{197}Hg).

Wszystkie koniugaty zsyntezowano zgodnie ze schematem przedstawionym na poniższym rysunku

(Rys. 1), a następnie oceniono ich potencjał terapeutyczny *in vitro* na liniach komórek nowotworowych potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) i glejaka wielopostaciowego (T98G).



Rys. 1. Schematyczna prezentacja syntezy PEGylowanych koniugatów nanocząstek złota z rtęcią.

Otrzymane koniugaty poddano badaniom w zakresie ich internalizacji do wnętrza komórek oraz do jądra komórkowego z wykorzystaniem metody frakcjonowania. Przeprowadzono również ocenę ich cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych oraz test cytotoksyczności MTS. Ponadto, za pomocą cytometrii przepływowej dokonano analizy indukcji apoptozy oraz wpływu koniugatów na cykl komórkowy badanych komórek.

Dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG przeprowadzono badanie indukcji dwuniciowych pęknięć DNA metodą detekcji fosforylacji γ -H2AX, wykazując istotny, zależny od zastosowanego stężenia promieniotwórczego, poziom uszkodzeń DNA.

Ponadto, dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG przeprowadzono ocenę jego działania na myszach z guzami indukowanymi z komórek 4T1.

Wykonano następujące badania *ex vivo*:

- analizę biodystrybucji po doustrowym podaniu radiokoniugatu oraz jego bezpośrednim wstrzyknięciu do guza,
- ocenę efektywności terapeutycznej radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o aktywności promieniotwórczej 10 MBq (podanie do guza) oraz
- ocenę efektywności terapeutycznej radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o aktywności promieniotwórczej 25 MBq (podanie do guza).

Rozdział drugi stanowi część literaturową pracy. Zawarto w nim przegląd literatury dotyczący potrójnie ujemnego raka piersi oraz glejaka wielopostaciowego, a także opis standardowych metod leczenia nowotworów. Opisano także zagadnienie terapii radionuklidowej ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania emiterów elektronów Augera. Przedstawiono również zalety i ograniczenia stosowania rtęci oraz radionuklidów rtęci w medycynie. Na zakończenie omówiono zastosowanie nanocząstek złota w terapii radionuklidowej oraz w nanobrachyterapii.

W rozdziale trzecim opisano metodologię oraz metodykę badań. Zawarto spis odczynników i aparatury wykorzystywanej we wszystkich eksperymentach, a także szczegółowe opisy procedur badawczych oraz zastosowanych metod analitycznych.

W rozdziale czwartym przedstawiono metodę syntezy oraz analizę właściwości fizykochemicznych nieradioaktywnego koniugatu $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, a także wszystkie uzyskane wyniki eksperymentalne. Opisano również wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych dla koniugatu niezawierającego izotopów promieniotwórczych, tj. $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$.

Na podstawie zebranych danych dotyczących właściwości fizykochemicznych koniugatu, takich jak jego rozmiar, potencjał zeta, widma UV-Vis, FTIR oraz analiza TGA — potwierdzono prawidłowość zastosowanej metodyki syntezy. Dzięki wstępnym badaniom biologicznym określono także stężenie rtęci, które nie wywołuje efektu cytotoksycznego w komórkach docelowych. Dodatkowo, przeanalizowano mechanizm śmierci komórkowej indukowany przez koniugat przy wyższych stężeniach.

W rozdziale piątym opisano wyniki obliczeń teoretycznych oraz eksperymentów dotyczących produkcji radionuklidów rtęci. W celu otrzymania izotopów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ przeanalizowano trzy metody produkcji:

- produkcję cyklotronową na drodze reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(\text{p}, \text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$,
- produkcję cyklotronową na drodze reakcji $^{197}\text{Au}(\text{d}, 2\text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ oraz
- produkcję reaktorową na drodze reakcji $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

W rozdziale tym omówiono szczegółowo wszystkie powyższe metody, w tym procesy rozpuszczania tarcz oraz otrzymywania prekursora $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ do dalszych badań. Ze względu na wysoki przekrój czynny oraz łatwość pracy z tarczą, spośród analizowanych metod, wybrano jedną metodę produkcji - $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, będącą punktem wyjściowym do dalszych eksperymentów z zastosowaniem radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.

W rozdziale szóstym przedstawiono wyniki badań dotyczących właściwości oraz potencjału przeciwnowotworowego radiokoniugatu nanocząstek złota zawierającego radionuklid rtęci - $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG-COOH. Zamieszczono wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* oraz badań biodystrybucji i efektywności terapeutycznej *ex vivo*.

Rozdział siódmy dotyczy możliwości zastosowania łączonej nanobrachyterapii (promieniowanie β^- oraz elektrony Auger) z użyciem radioaktywnych nanocząstek złota pokrytych emiterami elektronów Augera ($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$). W rozdziale tym przedstawiono wyniki badań stabilności radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ oraz jego działania *in vitro* na komórki nowotworowe linii MDA-MB-231 oraz T98G.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy opisano działanie oraz przeprowadzono analizę potencjału przeciwnowotworowego *in vitro* na liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G dla trzech koniugatów nanocząstek złota z rtęcią:

- nieradioaktywnego koniugatu $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$,
- radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zawierającego radionuklidy rtęci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$,
- radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zawierającego radionuklidy ^{198}Au oraz $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Warszawa, 25.06.2025 r.

Emilia Majka

Emilia Teresa Majka

Pegylated gold nanoparticles coated with $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ radionuclides - a new approach to Auger electron therapy of triple-negative breast cancer and glioblastoma multiforme

ABSTRACT

Cancers that lack specific receptor overexpression present a significant challenge for the development of new radiopharmaceuticals. These cancers are characterized by low survival rates and high metastatic potential. Metastatic triple-negative breast cancer has a mortality rate of 88%¹, while glioblastoma multiforme has a mortality rate of 93.1%.² However, brachytherapy can be utilized for both of these tumors. Consequently, this dissertation focuses on studies using cell lines derived from these tumors. By employing gold nanoparticles (AuNPs) as radionuclide carriers, the concept is expanded to nanobrachytherapy. Nanobrachytherapy is a technique that enables intratumoral drug administration without the necessity of targeting specific receptors. Utilizing radionuclides that emit Auger electrons, which are characterized by a high linear energy transfer and the ability to induce DNA double-strand breaks, we can effectively enhance the effectiveness of nanobrachytherapy by combining $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ with gold nanoparticles.

In this work, mercury radionuclides $^{197\text{m}}\text{Hg}$ ($T_{1/2}=23.8$ h, $E_{\gamma}=134$ keV, 34%) and ^{197}Hg ($T_{1/2}=64.14$ h, $E_{\gamma}=77$ keV, 19% and 279 keV, 6%) were employed to coat gold nanoparticles. These radionuclides are efficient emitters of Auger electrons (AE) and conversion electrons (CE). During the decay of $^{197\text{m}}\text{Hg}$, 19.4 AE with an average energy of 0.7 keV/AE and 1.6 CE with an average energy of 127.0 keV/CE are emitted. During the decay of ^{197}Hg , 23.2 AE with an average energy of 0.7 keV/AE and 0.8 IC with an average energy of 67.0 keV/CE are emitted.³

The aim of the work described in the thesis's first chapter includes the synthesis, characterization, and biological studies of the Au(Hg)NPs-PEG conjugate, as well as its radioactive counterpart, the Au($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$)NPs-PEG radioconjugate. This work also presents the synthesis and analysis of the synergistic therapeutic effect of the $^{198}\text{Au}(\text{}^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ radioconjugate, which incorporates both a beta radioactive isotope (^{198}Au) and Auger electron emitters ($^{197\text{m}}\text{Hg}$ and ^{197}Hg) in its structure.

All conjugates were synthesized according to the scheme shown in the figure below (Fig. 1), and their *in vitro* therapeutic potential was then assessed on triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) and glioblastoma multiforme (T98G) cell lines.

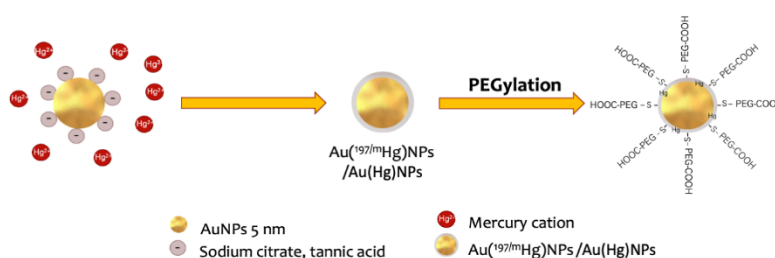


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of PEGylated gold nanoparticles' conjugates with mercury.

The obtained conjugates were evaluated for internalization into cells and the cell nucleus, and subjected to cytotoxicity studies on three-dimensional structures, as well as MTS cytotoxicity tests. Additionally, the analysis of apoptosis induction and the impact of conjugates on the cell cycle was studied using flow cytometry.

For the Au($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$)NPs-PEG radioconjugate, a study of the induction of DNA double-strand breaks using the γ -H2AX phosphorylation detection method revealed a significant level of double-stranded DNA breaks that depended on the concentration of radioactive radioconjugate used.

Additionally, the effect of Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG radioconjugates was evaluated on mice with tumors induced from 4T1 cells.

The following *ex vivo* studies were conducted:

- biodistribution study after intravenous and intratumoral administration of the radioconjugate,
- therapeutic efficacy study of 10 MBq Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG (intratumoral administration),
- therapeutic efficacy study of 25 MBq Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG (intratumoral administration).

Chapter two encompasses the literature section of the work. It includes a review of existing research on triple-negative breast cancer and glioblastoma multiforme, along with a description of standard cancer treatment. In addition, the issue of radionuclide therapy is described with particular emphasis on the use of Auger electron emitters. The advantages and limitations of using mercury and mercury radionuclides in medicine are also presented. Finally, the use of gold nanoparticles in radionuclide therapy and nanobrachytherapy is discussed.

Chapter three describes the methodology and research approach. It includes a list of reagents and equipment used in all experiments, along with detailed descriptions of the procedures and analytical methods employed.

Chapter four details the approach for synthesizing and analyzing the physicochemical properties of the non-radioactive Au(Hg)NPs-PEG-COOH conjugate, alongside all experimental results obtained. It also includes the results from *in vitro* studies performed on the conjugate, which does not contain radioactive isotopes, specifically Au(Hg)NPs-PEG-COOH.

Based on the collected data regarding the physicochemical properties of the conjugate, including its size, zeta potential, UV-Vis spectra, FTIR, and TGA analysis, the validity of the synthesis methodology was confirmed. Preliminary biological studies also established the mercury concentration that does not induce cytotoxic effects in target cells. Furthermore, the mechanism of cell death induced by the conjugate at higher concentrations was examined.

The fifth chapter presents the results of theoretical calculations and experimental findings related to the production of mercury radionuclides. To obtain the mercury radionuclides ^{197m/197}Hg, three methods were analyzed:

- cyclotron production through the nuclear reaction ¹⁹⁷Au(p, n)^{197m/197}Hg,
- cyclotron production through the nuclear reaction ¹⁹⁷Au(d, 2n)^{197m/197}Hg, and
- reactor production through the nuclear reaction ¹⁹⁶Hg(n, γ)^{197m/197}Hg.

This chapter discusses all the above methods, along with the processes of dissolving the targets and obtaining the ^{197m/197}Hg precursor for further studies. Due to the high reaction cross-section and the convenience of handling the target for routine synthesis, the ¹⁹⁶Hg(n, γ)^{197m/197}Hg production method was chosen as the starting point for further experiments using the Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG radioconjugate.

Chapter six presents the results obtained from the study on the properties and anticancer potential of the Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate, which combines gold nanoparticles with mercury radionuclides. It includes findings from *in vitro* studies as well as *ex vivo* biodistribution and therapeutic efficacy evaluation.

Chapter seven addresses the potential of using combined nanobrachytherapy (β-radiation and Auger electrons) using radioactive gold nanoparticles covered with Auger electron emitters (^{197m/197}Hg). This chapter presents the results of stability studies of the ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate and its *in vitro* effects on MDA-MB-231 and T98G cancer cell lines.

In summary, this work describes and analyzes the characteristics and *in vitro* anticancer potential of three gold nanoparticle conjugates with mercury on MDA-MB-231 and T98G cell lines:

- non-radioactive Au(Hg)NPs-PEG-COOH conjugate,

- Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate containing mercury radionuclides ^{197m/197}Hg, and
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate containing gold ¹⁹⁸Au and mercury ^{197m/197}Hg radionuclides.

Warszawa, 25.06.2025 r.

Emilia Majka