

Abstract

Cancer pathogenesis is complicated, but several common features can be identified for tumors, mostly linked with nutrient deprivation and hypoxia. The tumor microenvironment is often responsible for resistance of cancer to conventional treatments. Photothermal therapy (PTT) based on nanoparticles has emerged as a promising modality for cancer treatment, offering the potential to reduce adverse side effects from treatment, when combined with cancer-specific targeting. Nanoparticles preferentially accumulate at tumor site and can be activated by near-infrared (NIR) light, which penetrates tissue efficiently and induces localized heating, leading to tumor cell apoptosis. While precious metal-based nanoparticles have shown success in PTT, polyoxometalate (POM) nanoparticles present a cost-effective alternative with highly tunable photothermal properties, making them attractive for clinical translation. In this study, we investigated molybdenum-based polyoxometalate nanoparticles (MoO_x) for the development of a cancer-specific targeting therapeutic agent and examined their photothermal properties at different conditions.

In the first part, the goal was to further potentiate treatment efficiency and minimize the side-effects by employing both targeting moiety and the NIR-activated photothermal component. The MoO_x photothermal component was conjugated to either the monoclonal antibody M75, which targets cancer-specific carbonic anhydrase IX (CA IX) receptors, or to the RGDc peptide, which selectively binds to integrins of hypoxic cancer cells. These bioconjugates— MoO_x -M75 and MoO_x -RGDc—were thoroughly characterized throughout the functionalization process (optical spectra, size, crystalline and chemical structure) and evaluated in cell culture (toxicity, cell entry, binding specificity). Advanced imaging techniques, including Confocal Raman Microscopy and Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy, were employed to localize the nanoparticles within cells and to elucidate their cellular processing. Low toxicity, high binding specificity and cellular entry were confirmed for both bioconjugates.

In the second part, we systematically examined the photothermal properties of MoO_x nanoparticles under varying conditions. Factors such as pH, reduction state, and surface functionalization were found to significantly influence the photothermal response and the physico-chemical properties of MoO_x . Importantly for their biological application, pH was identified as a key factor, with the disappearance of MoO_x photothermal properties for

pH > 5 representing a challenge but also an opportunity to selectively target acidic lysosomes of hypoxic cancer cells. Oxidation state was identified as the key factor deeply affecting the structure and relaxation mechanisms after NIR-irradiation of the MoO_x, its photothermal properties. These effects were analyzed in detail by a handful of techniques (TEM, AFM, XRD, UV-vis, FTIR, Raman) and strategies to optimize MoO_x performance were proposed. Lastly, functionalization strategies which both preserve the MoO_x pH-response or prevent it were presented, including a novel approach to transfer highly hydrophilic MoO_x nanoclusters into organic phase. This research lays the groundwork for advanced applications of MoO_x nanoparticles in biological systems, optoelectronic devices, and chemical catalysis.

Abstrakt

Patogenéza rakoviny je komplikovaná, no je možné identifikovať niekoľko spoločných znakov nádorov, prevažne súvisiacich s nedostatkom živín a hypoxiou. Charakteristické mikroprostredie nádoru býva často zodpovedné za odolnosť nádoru voči konvenčným spôsobom liečby rakoviny. Fototermálna terapia (PTT) založená na nanočasticiach sa ukazuje ako nový spôsob liečby rakoviny, ktorý pri kombinácii s cielením na špecifické nádorové markery môže znížiť nežiaduce vedľajšie účinky liečby. Nanočastice sa prednostne akumulujú v nádore, kde môžu byť aktivované blízkym infračerveným (NIR) žiarením. NIR žiarenie efektívne preniká do tkaniva a zahrieva ho, čo vedie k apoptóze nádorových buniek. Nanočastice na báze vzácnych kovov vykazujú veľmi dobré fototermálne vlastnosti a polyoxometalátové (POM) nanočastice predstavujú ich dostupnú a efektívnu alternatívu s pridanou hodnotou v podobe modulovateľných fototermálnych vlastností, ktorá ich spolu s dostupnosťou robí atraktívnymi pre klinickú prax. V tejto práci sme skúmali polyoxometalátové nanoklastre na báze nestechiometrického oxidu molybdénu (MoO_x) s cieľom vyvinúť nové terapeutiká s účinkom cieleným na rakovinové bunky, a analyzovali závislosť fototermálnych vlastností MoO_x v rôznych podmienkach. V prvej časti bolo cieľom preskúmať účinnosť PTT liečby rakovinových buniek a s minimalizáciou nešpecifických interakcií a teda aj vedľajších účinkov. Navrhovaný preparát pozostáva z rozpoznávajúcej zložky (viažucej sa na rakovinový receptor) a fototermálneho komponentu aktivovaného NIR.

V úvodnej fáze boli fototermálne MoO_x konjugované buď s monoklonálnou protilátkou M75, ktorá sa viaže na rakovinové receptory karbonickej anhydrázy IX (CA IX), alebo s peptidom RGDc, ktorý selektívne rozpoznáva integríny hypoxických, typicky nádorových buniek. Tieto biokonjugáty — MoO_x -M75 a MoO_x -RGDc — boli podrobne charakterizované počas procesu funkcionalizácie (optické vlastnosti, veľkosť, kryštalická a chemická štruktúra) a ich vlastnosti boli testované tiež v bunkových kultúrach (toxická, vstup do buniek, väzbová špecificita). Na lokalizáciu nanočastíc v bunkách a objasnenie ich spracovania boli použité pokročilé zobrazovacie metódy vrátane konfokálnej Ramanovej mikroskopie a STED fluorescenčnej mikroskopie (mikroskopia so stimulovaným zhašáním fluorescencie). Pre oba typy biokonjugátov bola potvrdená nízka toxicita, vysoká špecificita väzby na rakovinové bunky, ako aj vstup do buniek.

V druhej časti sme vypracovali systematickú štúdiu fototermálnych vlastností nanočastíc MoO_x pri meniacich sa podmienkach. Faktory zahŕňali pH, stupeň redukcie a tiež funkcionalizáciu povrchu, ktoré všetky významne ovplyvňovali fototermálnu odozvu nanočastíc ako aj ich fyzikálno-chemické vlastnosti. Pre ich biologické využitie sa ako kľúčový faktor ukázalo pH, pričom vymiznutie fototermálnych vlastností MoO_x pri $\text{pH} > 5$ predstavuje výzvu ale aj príležitosť selektívne aktivovať PTT efekt v lyzozómoch hypoxických nádorových buniek s kyslým pH. Ďalším faktorom bol stupeň redukcie významne ovplyvňujúci štruktúru a relaxačné mechanizmy po ožiarení NIR svetlom, a tým aj fototermálne vlastnosti MoO_x . Tieto efekty boli detailne analyzované viacerými technikami (TEM, AFM, XRD, UV-vis, FTIR, Ramanovská spektroskopia) a boli navrhnuté stratégie pre prípravu MoO_x s optimálnymi PTT vlastnosťami. Nakoniec boli predstavené funkcionalizačné stratégie, ktoré zachovávajú špecifickú odozvu MoO_x materiálov na pH, ale aj také, ktoré jej úplne zabraňujú. Medzi ne patrí nová metóda na prenos vysoko hydrofilných MoO_x nanoklastrov do organickej fázy. Tento výskum predstavuje príspevok pre pokročilé aplikácie nanočastíc MoO_x v biologických systémoch, optoelektronických zariadeniach a tiež v katalyzátoroch.

Résumé

La pathogenèse du cancer est complexe, mais plusieurs caractéristiques communes peuvent être identifiées parmi les tumeurs, notamment en lien avec la privation de nutriments et l'hypoxie. Le microenvironnement tumoral joue souvent un rôle déterminant dans la résistance des cancers aux traitements conventionnels. La thérapie photothermique (PTT) basée sur les nanoparticules a émergé comme une modalité prometteuse pour le traitement du cancer, offrant la possibilité de réduire les effets secondaires indésirables lorsqu'elle est combinée à un ciblage spécifique des cellules cancéreuses. Les nanoparticules s'accumulent préférentiellement au niveau du site tumoral et peuvent être activées par la lumière proche infrarouge (NIR), qui pénètre efficacement les tissus et induit un échauffement localisé, entraînant l'apoptose des cellules tumorales. Bien que les nanoparticules à base de métaux précieux aient démontré leur efficacité en PTT, les nanoparticules de polyoxométalates (POM) représentent une alternative économique, dotée de propriétés photothermiques hautement modulables, ce qui les rend particulièrement attrayantes pour une éventuelle application clinique. Dans cette étude, nous avons exploré les nanoparticules de polyoxométalate à base de molybdène (MoO_x) en vue du développement d'un agent thérapeutique ciblé contre le cancer, et examiné leurs propriétés photothermiques dans différentes conditions expérimentales.

L'objectif initial était d'augmenter l'efficacité du traitement tout en minimisant les effets secondaires, en combinant un agent de ciblage avec un composant photothermique activé par la lumière NIR. Le composant photothermique MoO_x a été conjugué soit à l'anticorps monoclonal M75, ciblant les récepteurs de l'anhydrase carbonique IX (CA IX) spécifiques aux cellules cancéreuses, soit au peptide RGDc, qui se lie sélectivement aux intégrines des cellules cancéreuses hypoxiques. Ces bioconjugués— MoO_x -M75 et MoO_x -RGDc—ont été rigoureusement caractérisés tout au long du processus de fonctionnalisation (spectres optiques, taille, structure cristalline et chimique), puis évalués en culture cellulaire (toxicité, internalisation cellulaire, spécificité de liaison). Des techniques d'imagerie avancées, telles que la microscopie Raman confocale et la microscopie STED (déplétion par émission stimulée), ont été utilisées pour localiser les nanoparticules à l'intérieur des cellules et pour élucider leur traitement intracellulaire. Une faible toxicité, une forte spécificité de liaison et une bonne internalisation cellulaire ont été confirmées pour les deux bioconjugués.

Dans la seconde partie, nous avons examiné de manière systématique les propriétés photothermiques des nanoparticules MoO_x dans des conditions variables. Des facteurs tels que le pH, l'état de réduction et la fonctionnalisation de surface ont été identifiés comme influençant significativement la réponse photothermique ainsi que les propriétés physico-chimiques des MoO_x. Pour leur application biologique, le pH s'est révélé être un facteur clé : la disparition des propriétés photothermiques des MoO_x pour un pH > 5 représente à la fois un défi et une opportunité pour cibler sélectivement les lysosomes acides des cellules cancéreuses hypoxiques. Le degré d'oxydation a été identifié comme le facteur principal affectant profondément la structure et les mécanismes de relaxation après irradiation NIR, ainsi que les propriétés photothermiques des MoO_x. Ces effets ont été analysés en détail à l'aide de diverses techniques (TEM, AFM, XRD, UV-vis, FTIR, Raman), et des stratégies d'optimisation des performances des MoO_x ont été proposées. Enfin, des stratégies de fonctionnalisation permettant soit de préserver la réponse au pH des MoO_x, soit de la neutraliser, ont été présentées, incluant une approche innovante pour transférer les nanoclusters MoO_x hautement hydrophiles vers une phase organique. Cette recherche jette les bases d'applications avancées des nanoparticules MoO_x dans les systèmes biologiques, les dispositifs optoélectroniques et la catalyse chimique.