

NanoPredict

Innovative nanomaterials for detection of PIK3CA DNA point mutations for breast cancer therapy

Programm / Ausschreibung	Produktionstechnologien, Produktionstechnologien, Schlüsseltechnologien für nachhaltige Produktion Ausschreibung 2022	Status	laufend
Projektstart	01.04.2023	Projektende	31.12.2026
Zeitraum	2023 - 2026	Projektlaufzeit	45 Monate
Keywords	Nanoparticle, surface refinement, DNA mutation analysis, breast cancer		

Projektbeschreibung

Die Zahl der Krebserkrankungen in der Bevölkerung nimmt aufgrund der demografischen Alterung und der höheren Lebenserwartung stetig zu. Die am häufigsten auftretenden Krebsarten sind Brustkrebs bei Frauen und Prostatakrebs bei Männern sowie Lungenkrebs, der beide Geschlechter betrifft. Frühzeitige Diagnose und Prognose, Vorhersage des Ansprechens auf eine Krebstherapie und Krebsüberwachung (z. B. Nachsorge nach einer Operation) sind von entscheidender Bedeutung, um das Wohlbefinden des Patienten und seine Überlebenschancen zu verbessern.

Ein neuer Ansatz in der Krebsdiagnostik ist die Analyse zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) zum Nachweis zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA). Der Vorteil ist, dass die ccfDNA aus Blut (als "Flüssigbiopsie" bezeichnet) statt aus Gewebeprobe gewonnen werden kann und genetische Informationen über alle Krebsarten enthält.

Ein großer Nachteil ist jedoch die hohe ccfDNA Abbaugeschwindigkeit in Blutproben, die eine rasche Probenvorbereitung (z. B. Aufreinigung zu Plasma) und spezifische Lagerungsbedingungen (z. B. bei minus 80°C) erfordert. Diese Anforderungen können in der Regel nur von zentralisierten medizinischen Einrichtungen mit spezialisierten Labors (z. B. Krankenhäusern) erfüllt werden. Um eine dezentrale ccfDNA basierte Krebsdiagnostik zu ermöglichen, fehlt es jedoch an hochempfindliche Point-of-Care (POC) Nachweissysteme.

Im Rahmen des NanoPredict-Projekts zielen wir auf die Erforschung eines POC-Systems für den Nachweis von drei verschiedenen, mit Brustkrebs relevanten PIK3CA-Punktmutationen zur therapeutischen Unterstützung ab. Für die Realisierung werden siebgedruckte elektrochemische (EC) Biosensoren mit funktionellen Nanomaterialien untersucht. Der PIK3CA-Assay erfordert verschiedene Arbeitsschritte, wie den isothermen Amplifikationsschritt, die Reinigung der amplifizierten DNA (unter Verwendung von magnetischen Beads), die mutationsspezifische Oberflächenhybridisierung unter definierten Bedingungen (z.B. 55°C) und die Detektion auf siebgedruckte EC-Biosensoren. Am AIT konnten bereits Nachweisgrenzen von 2300 Kopien pro Analyse demonstriert werden. Im Rahmen von NanoPredict wird der Assay in enger Zusammenarbeit mit der MUW weiter untersucht, um die Anforderungen an die analytische Sensitivität und Spezifität des POC-Systems anhand von klinischen Plasma und Gewebeprobe zu studieren. Die Entscheidung, siebgedruckte EC-Biosensoren auf flexiblen Substraten zu verwenden, ist durch die vielen Vorteile für die Herstellung von POC-Systemen gerechtfertigt, wie z.B. die kostengünstige Integration von diagnostisch relevanten Funktionseinheiten und die Möglichkeit, die Herstellung mittels Rolle-zu-Rolle-Technologien zu skalieren.

NanoPredict konzentriert sich auf die Entwicklung des PIK3CA-Biosensorchips, indem zwei wichtige Funktionen durch den Einsatz von Nanomaterialien ermöglicht werden: a) ein im Siebdruckverfahren herstellbares Temperaturkontrollsystem auf der Grundlage organischer Nanomaterialien und b) ein mit Edelmetall-Nanopartikeln veredeltes Sensorelement zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Selektivität des Assays. Für a) werden die Heizstrukturen und Temperatursensoren entworfen und hergestellt, um eine homogene Temperatur von $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im DNA-Bindungsgebiete zu erreichen. Die Herstellung erfolgt durch Siebdruck von Kohlenstoff- und Polymer basierten Nanomaterialien, sowie einer Isolierschicht. Zu b) NanoPredict nutzt direkt die Ergebnisse früherer Studien am AIT, in denen die Veredelung der Arbeitselektroden mit Gold-Nanopartikeln (AuNPs) zu einer verbesserten PIK3CA-Punktmutationspezifität mit hohem Diskriminierungsfaktor führte. Die Mechanismen der Spezifitätsverbesserung und eine hochskalierbare, reproduzierbare Nanopartikelsynthese für die Sensorherstellung sind jedoch noch ungelöste Fragestellungen. Daher untersucht das NanoPredict Projekt die gepulste Laserablationssynthese in Flüssigkeiten (PLAL) zur Herstellung von AuNP-Nanopartikeln, AuPt-Legierungen und AuNP/Graphenoxid-Nanohybriden, die zu hochreinen Partikelsystemen mit definierten Ligandenhüllen und hochkonzentrierten Tinten führen. Diese Tinten werden mit Hilfe automatisierter Dosiertechnologien auf die Arbeitselektroden aufgebracht und ermöglichen eine systematische Untersuchung des Mechanismus der mutationspezifischen Oberflächenhybridisierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NanoPredict ein spannendes interdisziplinäres Projekt ist, das einen hohen Mehrwert bei der Realisierung von POC-Systemen für die Krebsbehandlung bietet und dazu beiträgt, die Lücke zwischen Nanotechnologie und klinischen Routineanwendungen zu schließen.

Abstract

The number of cancer incidences in the population is steadily increasing due to demographic aging and longer life expectancy. The most frequently occurring cancer types are breast cancer in women and prostate cancer in men, as well as lung cancer, which affect both genders. Early diagnosis and prognosis, prediction of response to cancer therapy and cancer monitoring (e.g. follow-up after surgery) are essential to increase the patient's well-being and chances of survival. A novel approach in cancer diagnostics is the analysis of circulating cell-free DNA (ccfDNA) to detect circulating tumour DNA (ctDNA). The advantage is that ccfDNA can be extracted from blood (referred to as "liquid biopsy") instead of tissue samples and contains genetic information of all types of cancers.

A major disadvantage, however, is the high degradation rate of ccfDNA in collected blood samples, which require rapid sample preparation (e.g. purification into plasma) and specific storage conditions (e.g. at minus 80°C). These requirements can usually only be met by centralised medical facilities with specialised laboratories (e.g. hospitals). In order to enable the decentralized ccfDNA based cancer diagnostics, highly sensitive point of care (POC) detection systems are still missing. In the NanoPredict project, we target the development of a POC system based on screen printed electrochemical (EC) biosensors with functional nanomaterials for the detection of three different breast cancer related PIK3CA point mutations for therapeutic support. The PIK3CA assay requires different working steps, such as the isothermal amplification step, the purification of the amplified DNA (using magnetic beads), the mutation specific surface hybridization under defined conditions (e.g. 55°C) and the detection on screen-printed EC biosensors. Detection limits of 2300 copies per analysis could already be demonstrated at the AIT. In NanoPredict, the assay will be further investigated in close cooperation with the MUW to study the demands on analytical sensitivity and specificity on the POC system. The choice to use screen-printed EC biosensors on flexible substrates is justified by the many advantages for the production of POC systems, such as the cost-effective integration of diagnostic-relevant functional units and the possibility to scale-up the fabrication using roll to-roll technologies.

NanoPredict focuses on the development of the PIK3CA biosensor chip by enabling two important functions through the use

of nanomaterials: a) A screen-printable temperature control system based on organic nanomaterials, and b) a sensor element refined with noble metal nanoparticles to increase the sensitivity and selectivity of the assay. For a) the heating structures and temperature sensors will be designed to obtain a homogenous temperature $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in DNA binding regions. The fabrication is realized by screen printing of carbon and polymer-based nanomaterials, and an isolation layer. For b) NanoPredict directly exploits results from previous studies at the AIT, in which the refinement of the working electrodes with gold nanoparticles (AuNPs) resulted in improved PIK3CA point mutation specificity with high discrimination factor. However, the mechanisms inducing the improvement of the PIK3CA point mutation specificity are still unclear. Another unsolved issue is the availability of a highly scalable, reproducible nanoparticles synthesis process suitable for sensor production. Therefore, the NanoPredict project investigates the pulsed laser ablation synthesis in liquids (PLAL) to produce AuNP nanoparticles, AuPt alloys and AuNP/Graphene Oxides nano-hybrids, which lead to ultra-pure particle systems with defined ligand shells, and high-density inks. These inks will be applied on the working electrodes using automated dispensing technologies, allowing the systematic study of the mutation-specific surface hybridization mechanism. In summary, NanoPredict is an exciting interdisciplinary project, which provides high added value in the realization of POC systems for cancer treatment and contributes to fill the gaps between nanotechnology and clinical routine applications.

Projektkoordinator

- AIT Austrian Institute of Technology GmbH

Projektpartner

- Medizinische Universität Wien
- Attophotonics Biosciences GmbH
- RHP-Technology GmbH