

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18928> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Porta, Fabiola

Title: Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems

Issue Date: 2012-05-09

Samenvatting

Het onderzoek in dit proefschrift beschrijft het ontwerpen van nieuwe toedienings strategieën met drug delivery nanocarriers op basis van oppervlak gemodificeerde mesoporeuze silica, zodat deze in staat zijn om gastmoleculen, zowel hydrofiel als hydrofoob, in vivo af te leveren.

De aflevering van geneesmiddelen in een vooraf gedefinieerd gebied is van cruciaal belang in de ontwikkeling van nieuwe therapieën, zeker gezien de verschillende bijwerkingen bij een systemische behandeling die de kwaliteit van leven van de patiënt kunnen aantasten.

De mesoporeuze silica nanodeeltjes (MSN's) moeten aan een aantal voorwaarden voldoen om een effectief drug delivery system(DDS) te bewerkstelligen.

Allereerst moet het DDS de lading (de actieve verbinding) bescherming bieden tegen enzymatische afbraak die in de bloedsomloop plaats zal vinden tijdens het transport naar de beoogde locatie.

In de tweede plaats moet het DDS er ook voor zorgen dat er geen vroegtijdig vrijkomen van de actieve verbinding plaats zal vinden (om bijwerkingen te voorkomen) en op afroep de lading afleveren op de bestemde plaats.

De silica-nanodeeltjes hebben door hun mesoporositeit een groot oppervlak waardoor er grote hoeveelheden geneesmiddel opgenomen kunnen worden, en een binnen en buiten oppervlak welke makkelijk te veranderen zijn, waardoor we eenvoudig verschillende nanokleppen kunnen creëren. Dit proefschrift beschrijft het ontwerp van MSN's om op twee manieren chemische verbindingen in vivo af te leveren. In eerste instantie werden gefunctionaliseerde MSN's op het buitenoppervlak gecoat met nanokleppen en door middel van deze kleppen werd het vrijkomen van de verbindingen geregeld. Het nanokleppen systeem bestaat uit een monolaag van mechanische vergrendelde moleculen (rotaxaan) bestaande uit een steel die het rotaxaan molecuul verankert aan het oppervlak met een afdichting die de lading in de poriën sluit en een stop aan het eind van de linker verbonden met de splitsbare binding.

In het tweede deel van dit proefschrift zijn silica nanodeeltjes gebruikt om hydrofobe geneesmiddelen in vivo af te leveren. Deze deeltjes zijn niet gemodificeerd met nanokleppen, maar het oppervlak werd homogeen bedekt met poly ethyleen glycol, dit om een lagere immuun respons te verkrijgen.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht van MSN's als potentiële DDS en de interactie met de cellulaire omgeving gegeven.

In **Hoofdstuk 2** wordt het ontwerp en de synthese van peptide gemodificeerde mesoporeuze silica nanocontainers (PMSN's) beschreven. PMSN's, een snap-systeem waarbij de top terminale peptiden fungeren als geactiveerde nanokleppen; door reductie van disulfide bindingen door glutathion (GSH), en cyclodextrine wordt er voor gezorgd dat gast moleculen niet ongewenst vrijkomen. Het terminal peptide is het 13-mer oligopeptide van de HIV-1 TAT peptide virus membraaneiwit dat verantwoordelijk is voor de translocatie van exogene moleculen door de plasmamembraan.

Door de hoge affiniteit van dit peptide voor het membraaneiwit kan het HIV-1 virus makkelijk de immuun cellen binnen dringen. Het TAT peptide werd gekozen om de affiniteit tussen de nanodeeltjes en de celmembraan van kanker cellen te vergroten.

Flow cytometrie analyse bevestigt de tendens dat PMSN's efficiënter in cellen worden opgenomen dan ongemodificeerde MSN's.

Deze waarneming werd ook gedaan door gebruik te maken van confocale laser scanning microscopie (CLSM), waar we zien dat de PMSN's zich in het cytoplasma van de HeLa cellen bevinden. In dit hoofdstuk wordt een gedetailleerde beschrijving van het vrijkomen van fluoresceïne uit de PMSN's gegeven als functie van de rotaxaan structuur.

Zowel de rol van het cyclodextrine op het vrijgeven van stoffen en het voorkomen van aggregatie in waterige omgeving werd bestudeerd. PMSN's zijn erg interessante nanoaflevering systemen, de opname in de cel wordt significant versterkt door de aanwezigheid van het TAT peptide. In dit systeem wordt de endocytose geactiveerd door de aanwezigheid van peptiden op het oppervlak, die de interactie met de celmembraan versterken. Deze eigenschap maakt dat het nanosysteem interessant is in vergelijking met de tot nu toe gesynthetiseerde nanodeeltjes, daar waarin de cellulaire opname bestond uit passieve endocytose. De hoge affiniteit van het TAT peptide voor de celmembraan zorgt (in elk geval) voor selectiviteit naar bepaalde cellen, daarom beschrijven we in hoofdstuk3 de syntheses en karakterisering van MSN's gericht tegen bepaalde kankercellen.

MNS's met een nanokleppen systeem zoals beschreven in **Hoofdstuk 3** werden gemodificeerd met foliumzuur. Het rotaxaan systeem bestaat uit een alifatische steel verankerd aan het oppervlak van de nano deeltjes waar een cyclodextrine aan gekoppeld is om zo ongecontroleerd lekkage van de lading te voorkomen. Om de cyclohexidine op zijn plaats te houden is er een foliumzuur groep gekoppeld aan de steel.

Dit systeem wordt geactiveerd in cellen door hydrolyse van de esterbinding in de rotaxaan, met als resultaat afgifte van geneesmiddelen.

Een verhoogde opname van foliumzuur gemodificeerde MSN's is aannemelijk omdat foliumzuur receptoren tot overexpressie komen in meer dan 40% van de menselijke tumoren. De kinetiek van het vrijgeven van een model geneesmiddel werd grondig bestudeerd. De nanoklep reageert op de actie van de esterase met als resultaat het vrijkomen van de inhoud. Bovendien is er geen lekkage van dit test geneesmiddel waargenomen wanneer de MSN's opgenomen werden in medium zonder enzymen.

Met behulp van CLSM bekeken we de opname van de nanaodeeltjes, de MSN's werden zowel in het cytoplasma als in de kern van de kankercellen waargenomen.

Het is van belang dat deze MSN's kern folaat receptoren bevat, waardoor we internalisatie in de celkern krijgen. Deze folaat receptoren gemodificeerde MSN's laten een gecontroleerde afgifte van gast moleculen en doelgerichte aflevering van stoffen zien, specifiek in de kanker cellen. Om de afgifte van een reactief geneesmiddel te onderzoeken gebruiken we foliumzuur gemodificeerde MSN's die geladen zijn met het antikanker medicijn camptothecine, en na het vrijkomen ervan kijken we naar de biologische effecten van dit middel op de kanker cellen.

Een apoptose assay (TUNEL) en western blot experiment werden uitgevoerd om aan te tonen dat apoptose veroorzaakt werd door het vrijkomen van dit antikanker medicijn.

Bij activering van de cel komt camptothecine vrij in het cytoplasma en we zagen dat bij 90 % van de kankercellen de apoptose toeneemt. Dus dit afleveringssysteem is in staat om kankercellen op te sporen en effectieve hoeveelheden van een geneesmiddel af te geven aan de cellen.

De afgifte van hydrofobe stoffen in *Xenopus laevis* met behulp van MSN's is beschreven in **Hoofdstuk 4**.

Wanneer vreemde deeltjes worden geïnjecteerd in levende dieren is het belangrijkste bijkomend effect de immuun reactie (de afweer), die uiteindelijk tot de dood kan leiden.

Daarom hebben we MSN's gemodificeerd met poly ethyleen glycol om de immuun respons te minimaliseren en *X. laevis* zo weinig mogelijk te belasten. De verwachte bescherming door de flexibiliteit van de PEG ketens en het hydrofiele schild resulteerde in een stabiele colloïdale oplossing. Bovendien voorkomen de PEG MSN's opsonisatie, een sterke immuun respons met een cascade van gebeurtenissen, die uiteindelijk leiden tot snelle fagocytose van het nano systeem. Terwijl de ongemodificeerde MSN's grote aggregaten laten zien blijven de PEG gemodificeerde nanodeeltjes goed verdeeld in de gebufferde oplossing. De afgifte van geneesmiddelen uit deze deeltjes werd onderzocht zowel in vitro als in vivo experimenten om aan te tonen dat de afgifte van dit geneesmiddel significante hoeveelheden biologische effecten zou hebben.

In dit onderzoek werd retenoïne zuur (RA) gekozen als model stof. RA speelt een cruciale rol gedurende de morfogenese en organogenese bij vertebraten.

Cruciaal omdat een overmaat van RA leidt tot misvormingen en tot een ongecontroleerde en chaotische expressie van genen in stadia van de ontwikkeling die betrokken zijn bij de activatie van specifieke receptoren die reageren met RA. Misvormingen veroorzaakt door RA dat uit de PEG MSN's vrijkomt, in vroege ontwikkelingsstadia in *X. laevis* werden aangetoond met in situ hybridisatie technieken en morfologische analyse van de embryo's. We keken naar de expressiepatronen van de volgende 4 genen: DII-3, DII-4, Krox-20 en OTX-2.

Het vrijkomen van RA werd bevestigd door verschillende expressiepatronen van de behandelde *X.laevis* ten opzichte van onbehandelde *X.laevis*.

Dit onderzoek toonde aan dat MSN's goed in staat zijn om hydrofobe verbindingen in vivo af te leveren en zo het beoogde biologische effect teweeg te brengen. Deze resultaten worden bevestigd door experimenten met zebrafissen.

In **Hoofdstuk 5** wordt de biocompatibiliteit aangetoond van silica nanodeeltjes in zebrafis embryo's. Ook hier is RA gebruikt als een model stof om een goede vergelijking te kunnen maken met de resultaten van **Hoofdstuk 4**. Morfologische en genetische studies in zebrafis embryo's zijn uitgevoerd na injectie met RA geladen MSN's.

De biocompatibiliteit van de PEG gemodificeerde silica nano deeltjes toont aan dat wanneer embryo's geïnjecteerd zijn met deze MSN's ze een normaal fenotype vertonen.

Er worden echter wel afwijkingen in de ontwikkeling waargenomen in embryo's wanneer deze zijn geïnjecteerd met RA geladen nano deeltjes. Deze waarneming wordt ook bevestigd door in situ hybridisatie van het *msxB* gen.

In **Hoofdstuk 6** wordt de toepassing van silica nano deeltjes als emulsie stabilisator (Pickering emulsie) onderzocht. De colloïdisomen hebben een geïsoleerde kern om zo een interne weerstand te creëren waardoor we deze beter kunnen manipuleren.

Er zijn 3 typen colloïdisomen gesynthetiseerd waarbij we verschillende nanodeeltjes gebruikten: MSN's, co-gecondenseerde MSN's en niet poreuze silica nanodeeltjes.

De kinetiek van het vrijkomen van fluorescente stoffen van de colloïdisomen als functie van de buitenste silica laag werd bestudeerd en de correlatie tussen de samenstelling van deze buitenste schil en het vrijkomen van de drug werd onderzocht.

Colloïdisomen die MSN's gestabiliseerd zijn laten een explosie van vrijgave van de drug zien terwijl colloïdisomen die niet poreus zijn een vertraagde vrijgave van de lading laten zien.

Ook is onderzoek gedaan naar de synthese van een dubbel geneesmiddel afgifte systeem, waarbij de buitenste schil bestaat uit gemodificeerde nanodeeltjes terwijl de kern met een gastmolecuul geladen is. We zagen een vertraagde vrijlating van de kern lading, die begon nadat de buitenste laag alle functionele groepen vrijgegeven had.

Een mogelijke toepassing van deze DDS's is bijvoorbeeld een implantaat die drugs afgeeft in de staartvin van volwassen zebravissen. Microcapsules geladen met RA zijn geïmplanteerd en we zagen een vertraging in de staart regeneratie. Na morfologische en genetische analyse zagen we een significante vertraging in de ontwikkeling door implantatie van RA capsules.

Conclusie: het onderzoek in dit proefschrift levert een belangrijke bijdrage in het valideren van zowel MSN's als DDS in levende organismen.

Een aantal DDS's op basis van silica werden gesynthetiseerd waarbij de vrijgave kinetiek te controleren is en daarbij blijkt dat de MSN's biocompatibel zijn. Terwijl de TAT-peptide functionalisering de opname in kanker cellen verbetert, zorgen foliumzuur modificatie en MSN's voor doelgerichte specifieke nanodeeltjes. Foliumzuur gemodificeerde silica nanodeeltjes zorgen voor nieuwe ontwikkelingen van afgiftesystemen zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**.

De opname door de cel van deze nano deeltjes wordt verhoogd door een foliumzuur te gebruiken die een ligand is voor folaat membraan receptoren, bovendien bereiken we zo dat we meer folaat receptoren tot expressie brengen bij tumorcellen. We zien een bredere toepassing van dit systeem in andere diermodellen , en kunnen zo de DDS's bestuderen.

We hebben deze DDS's reeds getest in twee verschillende diermodellen *Xenopus laevis* en *Danio rerio*

De biocompabiliteit van peptide- of foliumzuur oppervlak gemodificeerde silica nanodeeltjes werden uitgevoerd op celkweken terwijl we de poly ethyleen glycol nanodeeltjes met hun hogere biocompabiliteit voor de in vivo studies gebruikten.

De gesynthetiseerde MSN's kunnen een aanzienlijke hoeveelheid verbinding afleveren om zo het biologisch effect hiervan zowel in vitro als vivo te kunnen bestuderen.

Zo kunnen MSN's gebruikt worden als DDS's in farmacologisch onderzoek van hydrofobe verbindingen bij in water levende dieren, wat tot nu toe erg moeilijk uit te voeren was door de slechte oplosbaarheid van deze stoffen.

Ten slotte laten we de mogelijke toepassing zien van lokale toediening van medicijnen met behulp van het in vivo implanteren van microcapsules. De buitenlaag op deze MSN's maken deze beads zeer biocompatibel doordat er een reductie van de immuun respons

plaats zal vinden terwijl we de lading geleidelijk vrij kunnen laten komen, afhankelijk van waarmee deze deeltjes gemodificeerd zijn.

Dit onderzoek heeft zich vooral op de aflevering van hydrofobe verbindingen geconcentreerd, echter er zou een veel bredere toepassing van dit systeem met veel meer stoffen en verschillende proefdieren kunnen plaatsvinden.

De data zoals hier in dit proefschrift beschreven, nodigen uit tot een grondige vervolgstudie die nieuwe inzichten zal geven in de ontwikkeling van nieuwe DDS's en hun mogelijke toepassingen in nieuwe behandeltherapieën.