



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mesoporous silica nanoparticle-based protein delivery systems for biomedical applications

Tu, J.

Citation

Tu, J. (2016, December 21). *Mesoporous silica nanoparticle-based protein delivery systems for biomedical applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45230>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45230>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45230> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Jing Tu

Title: Mesoporous silica nanoparticle-based protein delivery systems for biomedical applications

Issue Date: 2016-12-21

Nederlandse Samenvatting en Perspectieven

Eiwitten spelen een cruciale rol in het leven en zijn betrokken bij alle vitale processen in het lichaam. Eiwitten worden daarom gebruikt als therapeutica voor diverse biomedische doeleinden. Echter bij toediening in het menselijk lichaam worden de meeste eiwitten afgebroken of geïnactiveerd. Voor een succesrijke eiwit-therapie zullen dan ook problemen rond stabiliteit en membraan-penetratie moeten worden opgelost. Van de huidige materialen die gebruikt worden voor het afleveren van eiwitten zijn mesoporous silica nanodeeltjes een van de meest veel belovende nano-voertuigen onder andere vanwege hun a) goede biocompatibiliteit, b) beschikbaarheid van veel protocollen voor hun synthese, c) gemakkelijke modificatie van hun oppervlak zodat de lading naar believen kan worden aangepast. Voor menige biomedische toepassing zijn monodisperse MSNs met een deeltjesgrootte van 50-200 nm, een chemisch-modificeerbare oppervlakte, en grote poriën (> 5 nm) gewenst.

In dit proefschrift is een nieuwe methode geïntroduceerd om MSNs met een kubusachtige geometrie (90×43 nm) te synthetiseren die bovendien grote schijfvormige poriën (10 ± 1 nm) bevatten. Voortbordurend op eerder onderzoek hebben we een eenvoudige synthetische route ontworpen voor een nieuw type MSNs met goede opname en afgifte eigenschappen. Om de gewenste porie-grootte te verkrijgen in een sub-200 nm deeltje werd als structuur-matrijs een dubbel-surfactant systeem gebruikt bestaande uit een hoog-moleculair gewicht block-copolymeer en fluorocarbons. 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) werd toegevoegd om de porie-diameter te vergroten. Deze MSNs werden gesynthetiseerd als stabiele colloïdale suspensies met een smalle grootte-verdeling en kanalen die parallel lopen aan de korte as. Een dergelijke “mesostructuur” bevordert een efficiënte overdracht van massa vanwege de hoge dichtheid aan openingen die zorgen voor snelle en efficiënte inkapseling van eiwitten. De inkapseling en afgifte van een zevental modeleiwitten (α -lactalbumine, ovalbumine, bovine serum albumine, catalase, hemoglobine, lysozym en cytochroom c) door deze MSNs werd bestudeerd in **Hoofdstuk II**. De hoge inkapselingsefficiëntie en controleerbare afgifte profiel voor een verscheidenheid aan eiwitten maken deze MSNs geschikt voor toepassingen in het veld van medicijnafgifte en eiwit-therapieën.

In **Hoofdstuk III** werd een nieuw intradermaal (onderhuids) afgifte systeem beschreven dat de voordelen van nano-deeltjes en micronealden combineert door pH-gevoelige micronealden te voorzien van lipiden-gecoate MSNs die een antigeen bevatten. Het negatief-geladen ovalbumine (OVA) werd gekozen als model-antigeen voor dit vaccinonderzoek.

Intradermale vaccinatie met micronealden is een pijnloze en effectieve methode van vaccineren. Om de immunogeniciteit van vaccins te verbeteren worden vaccins gebruikt die gebaseerd zijn op nanodeeltjes omdat deze zorgen voor een verhoogde antigen-stabiliteit in vivo en een langdurige afgifte op de plek van vaccinatie. Positief geladen silica nanodeeltjes (AEP-MSNs) met een porie-grootte van 10 nm zorgden voor een snelle inkapseling van ovalbumine (OVA) met een hoge ladingscapaciteit. De introductie van een lipide bilaag resulteerde in een verbeterde colloïdale stabiliteit van OVA-geladen-MSNs en voorkwam voortijdige afgifte van OVA. Bovendien faciliteerde de lipide bilaag de coating van de pH-gevoelige micronealden met deze nanodeeltjes. Toepassing van deze gecoate nanodeeltjes leidde tot de succesvolle afgifte van OVA-geladen nanodeeltjes in de menselijke huid (ex vivo) in een pH-afhankelijke manier.

Eiwit-afgifte in het cytosol van cellen is nog steeds een uitdagende opgave vanwege de inefficiënte cellulaire opname en ontsnapping van eiwitten uit endosomen naar het cytosol, hierdoor worden mogelijke klinische toepassingen beperkt. In **Hoofdstuk IV** bestudeerden we de intracellulaire afgifte van eiwit-bevattende MSNs door middel van lipopeptide geïnduceerde membraanfusie. Het positief geladen eiwit cytochroom c (CytC) dat van zichzelf niet door membranen heen kan werd in deze studie als model-eiwit gebruikt. CytC kon snel en in hoge hoeveelheden ingekapseld worden in MSNs. Om de colloïdale stabiliteit te verhogen en voortijdige afgifte van CytC te voorkomen werden ook deze nanodeeltjes voorzien van een lipide bilaag. Om directe afgifte in het cytosol te bewerkstelligen werd gebruikt gemaakt een complementair paar van *coiled-coil* peptides (CP₄E₄ en CP₄K₄) die via een cholesterol-anker in de lipide membraan van respectievelijk de nanodeeltjes en HeLa cellen werden aangebracht. De *coiled-coil* vormende lipopeptides zorgden voor de intracellulaire opname van CytC-geladen MSN deeltjes door middel van membraan-fusie van de lipide bilaag van de nanodeeltjes met het plasmamembraan van HeLa cellen. Vervolgens leidde de afgifte van CytC in het cytosol tot de activatie van apoptotische processen resulterend in celdood.

Naast de intracellulaire afgifte van eiwitten voor potentiële vaccinatie (OVA) en kankertherapie (CytC) gebruikten we ons MSN-gebaseerde eiwit-afgifte systeem ook voor andere klinische toepassingen zoals een erythrocyten-*mimic*. Hemoglobine (Hb), het meest voorkomende eiwit in bloed, is verantwoordelijk voor zuurstof-transport in het lichaam. Celvrije Hb wordt echter snel afgebroken en is te giftig om als bloedvervanger te dienen. In de afgelopen decennia zijn daarom diverse nanodeeltjes getest voor de inkapseling of chemische conjugatie van Hb als een mogelijk universele bloedvervanger. In **Hoofdstuk V**

werden Hb-gebaseerde zuurstof dragers gefabriceerd door MSNs te gebruiken om Hb in te kapselen en vervolgens af te dekken met een lipide-bilaag om de colloïdale stabiliteit te verhogen. De lipide-bilaag bestond uit fosfolipiden (DOPC, DOPE) en PEG-gemodificeerde lipiden (PEG₂₀₀₀PE) die dienden om de circulatietijd in de bloedcirculatie te verlengen. De bio-distributie en circulatie van deze nanodeeltjes getest in zebrawis embryo's als een alternatief in vivo proefdiermodel voor real-time beeldweergave. Na injectie verspreidden de nanodeeltjes zich snel in de bloedbaan.

De MSNs die beschreven werden in dit proefschrift kunnen naast belading met therapeutische eiwitten voor vaccinatie, kankertherapie en kunstmatig bloed (**Hoofdstukken III, IV en V**) ook ingezet worden als nanotransporter voor een wijd scala aan eiwitten voor andere biomedische toepassingen. Bijvoorbeeld lysozyme, dat van nature een antimicrobieël enzym is komt veelvuldig voor in de natuur. Echter de antimicrobiële effectiviteit is beperkt door de lage stabiliteit en matige opname door bacteriën. MSNs zouden, als transportmiddel voor allerlei antimicrobiële eiwitten, de effectiviteit van deze eiwitten kunnen verbeteren door verhoging van hun stabiliteit en opname door bacteriën. Andere toepassingen zijn mogelijk op het gebied van weefsel-engineering, waarbij groeifactoren gebruikt worden om de groei van bepaalde weefsel te stimuleren. Echter veel van deze groeifactoren hebben inherent lage stabiliteit in de bloedbaan en dus een korte levensduur na toediening. MSNs met hun excellente biocompatibiliteit en aanpasbare structuur zijn mogelijk geschikt voor het laden en gecontroleerd lossen van een reeks van deze groeifactoren.

Talrijke eiwitten moeten intracellulair vervoerd worden om hun therapeutisch effect te bereiken, dit vereist custom-designed nanocarriers voor ieder probleem. Bijna elk eiwit vereist endolysosomale ontsnapping om de gewenste subcellulaire compartimenten te bereiken. Een van de weinige uitzonderingen is catalase, dat actief is in het zure milieu van endosomen en ischemisch pathologische foci (pH4-6) en waterstofperoxide onschadelijk maakt bij behandeling van vasculaire oxidatieve stress.

Compartimentalizing is in de biologie een belangrijke methode om reactieve moleculen te scheiden in een cel.⁶⁸ Geïnspireerd door deze compartimenten in cellen kan co-encapsulatie van meerdere enzymen in MSN een veelbelovende methode zijn om een synthetische cel te creëren. Bijvoorbeeld, gebaseerd op de resultaten van **hoofdstuk V** kunnen anti-oxidatie enzymen (superoxide dismutase en catalase) toegevoegd worden aan hemoglobine-bevattende zuurstofdragers (LB-MSNs) om de complexiteit in structuur en functie te verhogen en deze erythrocyten-*mimic* te beschermen tegen ernstige hypoxia.

Behalve eiwitten kunnen ook andere functionele biomoleculen zoals siRNAs worden geladen in dit nieuwe type MSN en vervolgens afgeleverd worden in cellen. Sinds de eerste publicatie over *gene silencing* in dierlijke cellen in 1998 wordt RNA interferentie (RNAi) wereldwijd gezien als een veelbelovende technologie voor behandeling van ziektes. Echter een belangrijk obstakel voor klinische toepassing is het gebrek aan geschikte transporters om *short interfering* (si) RNAs af te leveren. siRNAs zijn geschikt als medicijn omdat ze niet hoeven te integreren in het genoom en omdat ze eenvoudig te synthetiseren zijn. Niet minder dan 22 RNAi-gebaseerde drugs hebben hun weg gevonden tot klinische trials. Zoals ook met eiwitten het geval is, zal voor de afgifte aflevering van siRNA in cellen een aantal hordes genomen moeten worden aangezien siRNAs niet membraan-permeabel zijn en gevoelig voor afbraak door lichaamsvloeistoffen. Om siRNAs in het cytoplasma te krijgen wordt een verscheidenheid aan nanodeeltjes toegepast. De bestaande literatuur beschrijft MSNs als niet-virale vector voor siRNA afgifte. Deze MSNs beschikken over het kationische polyethyleenimine (PEI) aan het oppervlak en kunnen door middel van electrostatische interacties siRNAs binden. Bekend is dat siRNAs met een lengte van 21 tot 23 basenparen (~13 kDa) meerdere negatieve ladingen bevatten en zodoende vergelijkbaar zijn met het negatief geladen α -lactalbumine (14.2 kDa, pI 4.5). Encapsulatie van siRNAs door PEI-gemodificeerde MSNs kan worden gevolgd door bedekking met een lipide bilaag die voorzien kan worden van fluorescerende kleurstoffen, of *targeting* moleculen voor *imaging* en *targeting*. Toekomstige studies zullen de potentiële toepassingen van dit nieuwe type MSNs met of zonder lipide laag als delivery systeem voor biomacromoleculen moeten aantonen.