



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Photo-activated drug delivery systems

Kong, L.

Citation

Kong, L. (2018, June 7). *Photo-activated drug delivery systems*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/63080>

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/1887/63080>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/63080>

Author: Kong, L.

Title: Photo-activated drug delivery systems

Issue Date: 2018-06-07

Samenvatting en Perspectiven

O-Nitrobenzyl groepen worden veel gebruikt als moleculaire beschermgroepen die met licht verwijderd kunnen worden. Deze zogenaamde photocages worden reeds vaak toegepast in zowel de organische chemie^[1] als in de biologie^[2]. Photocaging blokkeert de functionaliteit van een molecuul en deze kan weer verwijderd worden door middel van licht met een specifieke golflengte. De mogelijkheid om precies te controleren waar en wanneer het beschermde molecuul belicht wordt maakt het mogelijk om precies te controleren waar en wanneer een photocaged molecuul geactiveerd wordt. Toepassing van photocages bij geneesmiddel bezorgsystemen (nanomedicijnen) leidt er toe dat men de afgifte van medicijnen kan controleren door middel van licht.

O-Nitrobenzylgroepen worden gebruikt voor het beschermen/inactiveren van verscheidene therapeutica^[3], zoals bijvoorbeeld, eiwitten en nucleïne zuren, maar ze worden ook toegepast op complexe meercomponentsystemen zoals nanomedicijnen, hydrogelen, micellen, liposomen en anorganische nanodeeltjes.^[4] In dit proefschrift zijn *o*-nitrobenzyl groepen gebruikt als fotolabiele verbindingsgroep tussen het wateroplosbare polymeer polyethyleenglycol (PEG) en verschillende type nano medicijnen (**Hoofdstukken 2-4**), of als lichtactiveerbare beschermgroep voor specifieke chemische functionaliteiten (**Hoofdstuk 5**). In deze voorbeelden leidde het gebruik van de *o*-nitrobenzyl groep tot volledige controle over waar en wanneer een nanomedicijn geactiveerd wordt.

In **Hoofdstuk 2**, beschrijf ik de strategie om membraanfusie tussen twee complementaire liposoompopulaties te controleren. Dit werd bereikt door de introductie van een fotolabiele PEG-corona op het oppervlak van deze fusogene liposomen. De PEG-corona blokkeert effectief de interactie tussen twee complementaire liposoom populaties. De minimaal noodzakelijke lengte van PEG die nodig is om effectief peptide-peptide interacties te verhinderen werd bepaald en er bleek een directe correlatie te zijn tussen de tijd van belichting en de mate van membraanfusie. Gebruikmakend van een LED lichtbron kon membraanfusie direct

geïnitieerd worden. Door deze methode toe te passen bij levende cellen kon de interactie met liposomen gecontroleerd worden met controle over waar en wanneer deze interactie plaatsvond. Door middel van licht werden de PEG-corona verwijderd van het oppervlak van liposomen wat leidde tot de spontane interactie met de cellen (voorzien van complementaire lipopeptides) resulterend in de accumulatie van liposomen op het cel oppervlak. Dit project is het eerste voorbeeld van gecontroleerde membraanfusie door middel van licht. Membraanfusie is in de Natuur een sterk gereguleerd proces, in tijd en plaats, om cellulaire functies goed te laten verlopen. De beschreven mogelijkheid om membraanfusie te controleren met licht maakt het in de toekomst mogelijk om meer efficiënte nanomedicijnen te ontwikkelen, gebaseerd op in liposoom geëncapsuleerde geneesmiddelen die met controle over tijd en plaats hun medicijnen kunnen afgeven. Door gebruik te maken van membraanfusie worden de medicijnen direct afgegeven in het cytosol van cellen waarmee opname door middel van endocytose vermeden wordt wat kan leiden tot een meer efficiënte medicijnafgifte.

In de **hoofdstukken 3 en 4** werd de *o*-nitrobenzyl groep gebruikt in 2 prodrugsystemen: PEG₂₀₀₀-*o*-nitrobenzyl-doxorubicine (**hoofdstuk 3**) en PEG₂₀₀₀-*o*-nitrobenzyl-nervonzuur (**hoofdstuk 4**). In **hoofdstuk 3**, vormt de prodrug PEG₂₀₀₀-*o*-nitrobenzyl-doxorubicine micellen welke door lichtactivatie uiteenvallen en daardoor snel en kwantitatief doxorubicine (DOX) afgeven. Deze prodrug-micellen lijken qua grootte en oppervlakte chemie veel op de voor klinisch gebruik goedgekeurde liposoom-doxorubicine formuleringen zoals bijvoorbeeld Doxil®. Dit nanomedicijn wordt passief opgenomen in vaste tumoren via het zogenaamde “enhanced permeation and retention” (EPR) effect. Een nadeel van Doxil zijn de cardiotoxische neveneffecten die ontstaan door voortijdig verlies van doxorubicine buiten de tumor. De hier beschreven prodrug heeft dit probleem niet en is daardoor interessant voor verdere studies als medicijn voor de behandeling van vaste tumoren.

Onder invloed van lage intensiteit UV-straling werd complete fotolyse van de prodrug tot het farmacologisch actieve DOX bewerkstelligd binnen 25 minuten. In de afwezigheid van licht werd geen cytotoxiciteit waargenomen voor prodrug concentraties tot 100 µM. De lichtdosering die nodig is voor de volledige conversie

van de prodrug naar DOX volledig leidde niet tot significante foto-geïnduceerde cytotoxiciteit. De door licht geactiveerde cytotoxiciteit van de vrijgekomen DOX was gecorreleerd met zowel stralingstijd als prodrug concentratie. Spatiotemporele controle over de DOX-afgifte aan cellen in kweek kon verkregen worden door middel van deze methode. Dit systeem heeft de potentie om zich niet alleen passief te richten op de vaste tumoren via het EPR effect, maar ook door het voorkomen van lekkage van geneesmiddelen onderweg naar de tumoren. Terwijl de kwantitatieve afgifte gewaarborgd blijft, kunnen de bijwerkingen significant vermindert worden in vergelijking met huidige generatie goedgekeurde kanker-nanomedicijnen.

Het is bekend dat de lipide-samenstelling en de dikte van de celmembranen significante invloed kan hebben op de activiteit van specifieke membraaneiwitten. De celmembraandikte verandert indien cellen vetzuren met extra lange keten (vlcFA) als biosynthetische voorlopers van extra lange fosfolipiden (vlcPL) op kunnen nemen. De opname van de vlcFA's wordt echter bemoeilijkt door de extreme onoplosbaarheid van deze vetzuren in water. In **hoofdstuk 4** werd dit probleem opgelost door het synthetiseren van lichtgevoelige vlcFA-PEG (PEG₂₀₀₀-*o*-nitrobenzyl-nervonzuur; FA24:1) amfifiele conjugaten die in water spontaan micellen vormen. Deze micellen worden spontaan opgenomen in lipide bilagen (zowel liposoom membranen als cel membranen) waardoor vlcFA-PEG in de bilaag komt. Door middel van licht werd de binding tussen het vetzuur en PEG verbroken waardoor het vrije nervonzuur achterbleef in het (cel)membraan. Afgifte van nervonzuur in gekweekte cellen leidde tot de verwerking van dit vetzuur tot cellulaire fosfolipiden met een verhoogd vlcFA gehalte. Deze methode is dus een efficiënte manier om de compositie en dus de dikte van celmembranen te modificeren. In toekomstige studies willen we de effecten van vlcPL verrijkte celmembranen op de activiteit van γ -secretase bepalen. Dit membraan gebonden protease speelt een belangrijke rol in het ontstaan van de ziekte van Alzheimer. In vitro studies hebben aangetoond dat de concentratie van door γ -secretase gevormde pathogene A β -peptides sterk vermindert indien γ -secretase ingebed is in "dikke" membranen bestaande uit extra lange fosfolipiden (vlcPL, bijv. diC24:1, nevon).^[5] De hier beschreven mogelijkheid om de celmembraan compositie aan te kunnen passen maakt onze aanpak potentieel attractieve om de allosterisch

γ -secretase activiteit te moduleren en daarmee het risico op de ziekte van Alzheimer te reduceren.

In tegenstelling tot de dePEGylering strategieën beschreven in de hoofdstukken 2-4 werd in **hoofdstuk 5** de *o*-nitrobenzyl groep om de lading van liposomen te veranderen van neutraal naar kationisch onder invloed van licht. Liposomen geformuleerd met beschermde (“caged”) lipiden circuleerden vrij in de bloedvaten van zebravis embryo’s. Fotolyse van *o*-Nb photocages *in situ* en *in vivo* resulteerde in een verandering van de oppervlaktelading van de liposomen van neutraal naar kationisch. Dit op zijn beurt leidde tot niet-specifieke adsorptie van de liposomen in alle bloedvaten van de zebravis. De liposomen werden vervolgens opgenomen door de endotheel cellen waardoor de inhoud van de liposomen in deze cellen vrijkwam. Door het in-situ aanpassen van de oppervlaktelading van liposomen werd dus controle gekregen over het in vivo gedrag van deze nanomedicijnen. Daarnaast is dit het eerste voorbeeld van een lichtgevoelig nanomedicijn waarvan de integriteit van de geneesmiddelen drager (het liposoom) niet aangetast of zelfs vernietigd werd door lichtactivatie. Dit is een belangrijke stap om gerichte afgifte van membraan ondoordringbare ladingen (bijv. DNA, peptiden en eiwitten) in cellen *in vivo* te realiseren.

De hoofdstukken beschreven in dit proefschrift laten zien dat licht gebruikt kan worden om precieze controle te verkrijgen over waar en wanneer geneesmiddelenafgifte plaatsvindt. Het is belangrijk om ook de nadelen van het gebruik van licht als activator van therapeutica te zien om daarmee deze beperkingen in de toekomst op te kunnen heffen. Voor de in dit proefschrift gebruikte *o*-nitrobenzyl groep vindt optimale fotolyse plaats met energierijk UV licht (365 nm, UV-A). Deze golflengte heeft een beperkte weefsel penetratiediepte (100-200 μm) en kan gepaard gaan met significante cytotoxiciteit als neveneffect. Voor het verder ontwikkelen van deze technologie om toepassingen in de kliniek mogelijk te maken moeten deze kwesties aangepakt worden. Een mogelijke oplossing is het gebruik van glasvezel-gebaseerde endoscopische technieken om het licht dieper in het weefsel te krijgen. Deze techniek wordt al routinematig gebruikt bij foto-dynamische therapieën.^[6] Een tweede optie is gebruik te maken van twee-foton excitatie, waarbij

2 licht fotonen combineren om de *o*-nitrobenzylgroep te activeren.^[7] De voordelen van twee-foton excitatie zijn het gebruik van nabij-infrarood licht waardoor de penetratiediepte van dit licht in het weefsel groter is (>1 cm). Tevens is de cytotoxiciteit van het licht verwaarloosbaar. Echter het grootste nadeel van twee-foton excitatie is het significante verlies in fotolyse efficiëntie ten opzichte van één-foton excitatie. Daarom is de ontwikkeling van nieuwe photocages met verbeterde 2-foton absorptie profielen van groot belang voor deze technologie.^[8]

Elk hoofdstuk in dit proefschrift beschrijft een nieuwe technologie gericht op het overkomen van de limitatie van de huidige nanomedicijnen. De beschreven onderzoeken zijn op dit moment fundamenteel van aard. Echter doordat dit onderzoek steeds meer verschuift richting studies in levende organismen en doordat de technologie die lichtactivatie mogelijk maakt in patiënten steeds verder verbetert zullen de beschreven onderzoeken steeds relevanter worden om uiteindelijk toegepast te worden in klinische toepassingen. Licht-geactiveerde nanomedicijnen gaan een schitterende toekomst tegemoet!

Referenties:

- [1] N. Kretschy, A. K. Holik, V. Somoza, K. P. Stengele, M. M. Somoza, *Angew Chem Int Edit* **2015**, *54*, 8555-8559.
- [2] P. Klan, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem Rev* **2013**, *113*, 119-191.
- [3] (a) S. K. Choi, M. Verma, J. Silpe, R. E. Moody, K. Tang, J. J. Hanson, J. R. Baker, *Bioorgan Med Chem* **2012**, *20*, 1281-1290; (b) C. Marini, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Bioorgan Med Chem* **2004**, *12*, 2749-2757.
- [4] M. S. Kim, J. Gruneich, H. Y. Jing, S. L. Diamond, *J Mater Chem* **2010**, *20*, 3396-3403.
- [5] Winkler, E.; Kamp, F.; Scheuring, J.; Ebke, A.; Fukumori, A.; Steiner, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 21326–21334.

[6] M. E. J. Ortner, K. Caca, F. Berr, J. Liebetrueth, U. Mansmann, D. Huster, W. Voderholzer, G. Schachschal, J. Mossner, H. Lochs, *Gastroenterology* **2003**, *125*, 1355-1363.

[7] F. Helmchen, W. Denk, *Nat Methods*, **2005**, *2*, 932-940.

[8] (a) T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *P Natl Acad Sci USA*, **1999**, *96*, 1193-1200; (b) K. Peng, I. Tomatsu, B. van den Broek, C. Cui, A. V. Korobko, J. van Noort, A. H. Meijer, H. P. Spaink, A. Kros, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 4881–4887.