



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Gaining control of lipid-based nanomedicine by understanding the nano-bio interface

Pattipeiluhu, R.

Citation

Pattipeiluhu, R. (2021, December 9). *Gaining control of lipid-based nanomedicine by understanding the nano-bio interface*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3245795>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3245795>

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

Nederlandse samenvatting

In het jaar 1900 beschreef Paul Ehrlich het concept van de “*magic bullet*”, waar wordt verwezen naar een medicijn dat zich met hele hoge precisie richt op ziekmakende cellen, zonder schade te brengen aan gezonde cellen. Hiermee kunnen bijwerkingen van medicatie tot het verleden worden gerekend. Traditioneel worden antibiotica gezien als medicatie die het meest in de buurt komen van *magic bullets*, aangezien zij in staat zijn om selectief bacteriële cellen te doden en menselijke cellen met rust te laten. Echter, in de moderne geneeskunde, worden deze algemene medicijnen niet langer beschouwd als de ideale strategie. In plaats daarvan wordt juist gekeken naar gepersonaliseerde medicijnen die met precisie van een *magic bullet* de moleculaire defecten van individuele patiënten kunnen repareren, bijvoorbeeld in de vorm van genterapie.

Het toepassen van nanotechnologie wordt gezien als een van de meest veelbelovende manieren om deze strategie te realiseren. Nanotechnologie is een veld binnen de wetenschap dat zich richt op de het maken van functionele systemen kleiner dan 100 nm, in grootte vergelijkbaar met een virus. Het is hierbij aan de wetenschapper om de juiste zuivere moleculaire componenten en fabricatiemethode te kiezen, zodat de verschillende componenten door hun chemische eigenschappen een nanosysteem vormen, bijvoorbeeld in de vorm van een bolvormig nanodeeltje. Als een van deze componenten dan ook nog het actieve medicijn is dan kan er worden gesproken over zogeheten **nanomedicatie**. Het grootste voordeel van nanomedicatie is dat fragiele, zeer toxische, of slecht te transporteren medicatie, alsnog selectief zijn doel kan bereiken in het menselijk lichaam. Een vaak toegepaste strategie is bijvoorbeeld een anti-kanker medicijn beschermen door andere componenten in een nanodeeltje en selectief naar een celtype in het lichaam transporteren. Hiermee is het niet direct beschikbaar voor opname in alle cellen dat het tegenkomt en kunnen ernstige bijwerkingen worden voorkomen.

Deze toepassingen van nanomedicatie heeft wetenschappers al tientallen jaren gefascineerd en heeft een grote hoeveelheid aan verschillende nanodeeltjes opgeleverd. Hierin kan worden gevarieerd met verschillende moleculaire componenten, zoals bijvoorbeeld lipiden, suikers, synthetische polymeren of eiwitten. Daarnaast wordt ook gekeken naar de actieve medicatie, bijvoorbeeld tegen kanker, ontstekingen en infecties. Het gaat hierbij voornamelijk om de juiste selectie van de verschillende componenten die leiden tot een goede assemblage, en de juiste therapeutische respons in een biologisch systeem.

Een recente doorbraak in dit onderzoeksveld zijn zogenaamde lipide nanodeeltjes (LNPs) voor het afleveren van ribonucleïne-zuren (RNA-moleculen). Lipiden zijn vetten, of vetachtige moleculen, die bijvoorbeeld een cruciale rol spelen in het maken van celmembranen. De lipiden die worden gebruikt in deze nanosystemen kunnen zowel een biologische oorsprong hebben, of synthetisch zijn. Aangezien het vaak gaat om zeer vergelijkbare moleculen als die we in ons lichaam tegenkomen, is de afbraak van deze componenten makkelijk en worden de nanodeeltjes goed getolereerd. Ook de RNA-moleculen hebben vaak een endogene biologische functie, zo zorgen bijvoorbeeld zogenaamde *messenger* RNA-moleculen (mRNA) voor de productie van eiwitten in menselijke cellen. De lipide nanodeeltjes worden gemaakt uit individuele lipiden die samen met RNA-moleculen een nanosysteem vormen met een diameter van ~30-80 nm. Decennia van onderzoek naar verschillende lipiden hebben ertoe geleid dat RNA-afgifte in een voorspelbare en selectieve manier kan plaatsvinden. Dit zorgde in 2018 voor de goedkeuring van Onpattro® voor de behandeling van erfelijke transthyretine-gemedieerde amyloïdose (hATTR-amyloïdose) bij volwassenen met polyneuropathie. Recent zijn LNPs goedgekeurd voor het gebruik in de aflevering van mRNA in de coronavaccins van Pfizer/BioNTech en Moderna voor de bescherming tegen Covid-19.

Deze enorme therapeutische translatie voor nanodeeltjes is een bevestiging van tientallen jaren aan fundamenteel en klinisch onderzoek in deze richting. Door de goede tolerantie van het lichaam voor LNPs en de wijde toepasbaarheid van verschillende RNA-moleculen voor een grote variëteit aan ziektes, wordt de potentie van deze nanosystemen als mogelijke *magic bullets* nog groter.

In veel gevallen wordt het onderzoek naar nieuwe variaties van LNPs en hun toepassingen vaak empirisch uitgevoerd. Hier worden grote hoeveelheden aan verschillende lipide en RNA-moleculen gescreend en worden degenen met het beste effect gekozen voor een volgende ronde aan testen. Echter zijn hier vaak enorme faciliteiten, budget en tijd voor nodig. Daarnaast wordt er met deze strategie vaak belangrijke fundamentele kennis van de nanodeeltjes in biologische systemen genegeerd. Deze kennis geeft echter de mogelijkheid om verbeterde nanodeeltjes en nieuwe strategieën rationaal te ontwikkelen. In het onderzoek beschreven in deze dissertatie wordt juist fundamenteel gekeken naar het **gedrag van lipide nanosystemen in biologische systemen**, de zogeheten **nano-bio interface**.

Om deze kleine nanosystemen in een heel complex systeem te bestuderen, wordt gebruik gemaakt van een combinatie van chemische, biochemische en biofysische methoden, zoals chemische synthese, eiwit massaspectroscopie en elektronenmicroscopie. Daarnaast wordt

informatie verzameld over de interactie van nanodeeltjes met verschillende biologische systemen, zoals menselijk serum en plasma, in het lab gekweekte cellen, maak ook diermodellen zoals levende transparante zebra-embryo's en muizen. De onderwerpen waarnaar werd gekeken zijn de effecten van LNP-structuur op de biologische toepassing, de adsorptie van menselijke eiwitten aan lipide nanosystemen en de interactie van LNPs met receptoren in de bloedbaan. De resultaten zijn uiteengezet in vier experimentele hoofdstukken die ieder een ander onderwerp bestuderen:

In **hoofdstuk 2** wordt een nieuwe methode beschreven om eiwitadsorptie aan lipide nanosystemen, in dit geval liposomen, in menselijk serum te identificeren. Waar bestaande methodes gebaseerd waren op fysieke scheiding van de nanodeeltjes met eiwitten uit het serum, wordt hier een chemische methode gepresenteerd. Door middel van organische synthese werd een nieuw lipide molecuul gesynthetiseerd dat kan worden toegevoegd aan lipide nanosystemen. Dit lipide heeft twee belangrijke eigenschappen: ten eerste is het in staat om een binding te vormen met eiwitten aan de buitenkant van het nanodeeltje als het met specifiek Uv-licht bestraald wordt. Ten tweede kan dit lipide, gebonden aan het eiwit, selectief uit het menselijk plasma worden gezuiverd. Gekoppeld aan *eiwit massaspectroscopie* kunnen vervolgens de eiwitten die adsorberen aan het nanosysteem worden geïdentificeerd. Waar in vorige methoden veel interferentie was van grote en veel voorkomende eiwitten, zorgt deze nieuwe zuiveringstechniek voor een veel preciezere identificatie van de correcte geadsorbeerde eiwitten. Daarnaast kan de methode ook worden toegepast om de binding van specifieke eiwitten te valideren en zo vals-positieve eiwitidentificaties te vermijden.

In **hoofdstuk 4** gaat het onderzoek met de methode uit hoofdstuk 2 verder, en wordt de eiwit adsorptie geïdentificeerd van een specifieke selectie aan liposomen en uitgebreid naar LNPs die RNA-moleculen bevatten. In dit geval werden de belangrijkste eiwitten wederom gevalideerd en was er een duidelijk patroon zichtbaar van specifieke eiwitten die gebaseerd is op de oppervlakte lading van de verschillende nanodeeltjes. Daarnaast wordt door middel van inhibitie experimenten de *exacte positie van adsorptie van het eiwit apolipoproteïne E* aan negatief geladen liposomen bepaald. Dit gebeurt via een deel van het eiwit dat positief geladen is en daarmee een elektrostatische interactie kan aangaan. Echter, hetzelfde eiwit bindt neutraal geladen liposomen en LNPs niet op deze manier, maar namelijk via een ander domein. Dit verschil in binding kan het mogelijke verschil in uiteindelijke opname door verschillende levercellen verklaren. Deze informatie wordt daarmee gebruikt door collega's om te bestuderen op welke manier het ontbreken van dit eiwit een effect gaat hebben op de aflevering van deze lipide nanodeeltjes. Met de informatie die hieruit komt kunnen vervolgens nieuwe strategieën worden bedacht voor selectieve medicijnafgifte

door het manipuleren van de binding van dit specifieke eiwit. Bovendien laat dit werk ook voor de eerste keer de selectieve binding zien van specifieke eiwitten aan lipide nanodeeltjes met een moleculair detail, en kan de methode in de toekomst verder worden gebruikt voor soortgelijke ontdekkingen.

In **hoofdstuk 3** wordt het selectief afleveren van mRNA moleculen met LNPs in verschillende biologische systemen beschreven. Door gebruik te maken van fundamentele kennis van voorheen beschreven lipide nanosystemen, was het mogelijk om rationeel, en met minimale verandering tot het klinisch toegepaste Onpatro®, een LNP te produceren dat selectief mRNA aflevert aan de cellen van het *reticulo-endotheliaal systeem* in de lever. In dit geval werden *transparante zebrawis embryo's* gebruikt als veelzijdig diermodel om de nanodeeltjes in een levend systeem te kunnen bestuderen met behulp van fluorescentie microscopie. In dit geval kon worden herkend in welke cellen de nanodeeltjes terechtkomen en waar het mRNA dat codeerde voor fluorescente eiwitten goed tot werking kwam. Daarnaast zijn er meerdere genetische manipulaties mogelijk binnen zebrawissen die het mogelijk maken om het effect van individuele receptoren te bestuderen. Hiermee wordt bewezen dat de opname van de negatief geladen LNPs selectief gebeurt door de receptoren stabiline-1 en 2, die voornamelijk voorkomen op specifieke bloedvatcellen en macrofagen in de zebrawis. Aangezien het bekend is dat de geobserveerde cellen in de zebrawis overeenkomen met bloedvatcellen en macrofagen in de lever van zoogdieren, was er slechts een beperkt en gericht experiment nodig met muizen om deze strategie te bevestigen. Door het rationele ontwerp van de LNPs op basis van fundamentele kennis zijn veel tijd, geld en proefdieren gespaard gebleven. Het selectief afgeven van mRNA aan bijvoorbeeld de endotheelcellen in de lever zal door andere wetenschappers verder als strategie worden gebruikt om de juiste eiwitten to expressie te brengen die kunnen helpen bij leverziektes, zoals leverfibrose en kanker, maar ook voor het manipuleren van nodige immuunrespons die via deze celtypen werken.

In **hoofdstuk 5** wordt het effect op de efficiëntie van specifieke lipide structuren met RNA-moleculen in de kern van LNPs beschreven. De positie en interactie van RNA-moleculen in lipide nanosystemen is lastig te bestuderen en kan vrij willekeurig en zonder kenmerkende structuur voorkomen. Toch is het in sommige gevallen toch waargenomen dat bepaalde specifieke structuren kunnen vormen. Het is van grote interesse of deze geordende structuren een specifieke werking hebben op de efficiëntie van LNPs. In dit hoofdstuk wordt door het zorgvuldig selecteren van de lipide componenten en de verhoudingen ten opzichte van de RNA-moleculen voor de fabricatie, het mogelijk om LNPs te maken met gedefinieerde lipide-RNA structuren. Deze gedefinieerde structuren zijn lamellen (gelaagd), inverse hexagonaal of een mengsel van de twee. Aangezien de orde van grootte

van deze structuren tussen de 4 en 10 nm ligt, werd er gebruikt gemaakt van een combinatie van geavanceerde technieken om ze te bestuderen. Met behulp van *small-angle X-ray scattering* (SAXS) kon in het monster de hoeveelheid verschillende structuren kwalitatief in kaart worden gebracht. Uiteindelijk werd met *cryogene elektronenmicroscopie* (cryoEM) tot hele hoge vergroting (49.000x) ingezoomd op individuele LNPs en konden de structuren in de kern van het lipide nanosysteem worden gevisualiseerd en geanalyseerd. Met de gedetailleerde beschrijving van deze structuren kon een correct vergelijkend onderzoek worden uitgevoerd naar het verschil in efficiëntie. Er werd aangetoond dat LNPs met een *inverse hexagonale structuur* efficiënter RNA-moleculen afleveren in levende cellen. Verdere elektronmicroscopie studies tussen LNPs en kunstmatig gemaakte celmembranen laten zien dat het mechanisme van RNA vanuit een iners hexagonale structuur efficiënter verloopt via een 1-staps mechanisme, t.o.v. een 2-staps mechanisme in het geval van gelaagde structuren. Deze kennis kan worden gebruikt om de efficiëntie van LNPs met andere composities te verhogen, door het rationeel selecteren van de juiste componenten die het vormen van een iners hexagonale structuur bevorderen.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift een collectie aan alternatieve strategieën voor het begrijpen, ontwerpen en toepassen van lipide nanosystemen, waarin de rol van de bio-nano interacties centraal staan. Het onderzoeksgebied van de nanomedicatie kan gebruik maken van de specifieke voorbeelden die worden beschreven, maar er kan ook inspiratie worden opgedaan om de aanpak van onderzoek doen te verschuiven van een kostbare empirische aanpak naar rationeel gedreven ontwerpstrategie.

