



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Core cross-linked polymeric micelles based on polypept(o)ides: from secondary structure formation of polypeptides to functional cross-linking strategies for polymeric micelles

Bauer, T.A.

Citation

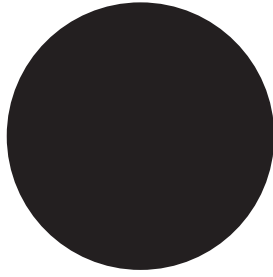
Bauer, T. A. (2022, June 9). *Core cross-linked polymeric micelles based on polypept(o)ides: from secondary structure formation of polypeptides to functional cross-linking strategies for polymeric micelles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3307845>

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/1887/3307845>

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



Nederlandse Samenvatting

Nederlandse Samenvatting

In dit proefschrift worden gecross-linkte polymere micellen (core cross-linked polymeric micelles, CCPMs) onderzocht en hun potentieel vergroot voor het transport van hydrofobe actieve farmaceutische ingrediënten. Met polypept(o)iden als de polymeerplatformtechnologie werden de fundamentele implicaties van secundaire structuurvorming op de ringopening polymerisatie van *N*-carboxyanhydriden (NCAs) en de zelf-assemblage van reactieve amfifiele polymeren onderzocht en geoptimaliseerd. CCPMs met functionele kernarchitecturen die externe of ziekte-gerelateerde stimuli bedienen, werden ontwikkeld. Om een robuuste CCPM-productie tot stand te brengen, mechanismen van geneesmiddelenresistentie te overwinnen en therapeutische middelen voor immunomodulatie te onderzoeken, werd polymeerwetenschap gecombineerd met organische en anorganische chemie.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over nanogeneeskunde en polypept(o)iden. Hier werd de reden verklaart voor het gebruik van nanocarriers om het farmacokinetisch profiel van actieve farmaceutische ingrediënten (APIs) te veranderen. Relevante dragersystemen werden gepresenteerd, en het belang van afscherming van het oppervlak om niet-specifieke opname door het mononucleaire fagocyten-systeem (MPS) te voorkomen werd geschetst. Het versterkte permeabiliteits- en retentie-effect (EPR) als een mechanisme voor de passieve aanrijking van geneesmiddelen in tumoren werd geïntroduceerd, kritisch besproken, en toekomstige trends werden bekendgemaakt. De actuele ontwikkelingen op het gebied van polymere micellen en CCPMs werden besproken. Verder werden polypept(o)iden onderzocht als een nieuwe klasse van functionele polymeren die volledig gebaseerd zijn op endogene aminozuren. Het mechanisme van de ringopening polymerisatie van NCAs werd uitgelegd, en huidige trends in NCA polymerisatie werden geïdentificeerd. Tenslotte werden de vroege en meest recente ontwikkelingen op het gebied van de biomedische toepassing van polypept(o)iden aangegeven.

In **hoofdstuk 2** werd de invloed van racemisch *S*-ethylsulfonyl-DL-cysteïne onderzocht om de ringopening polymerisatie te verbeteren voor polypeptiden die zoals polycysteïne tijdens de polymerisatie antiparallele β -platen ontwikkelen. De thiol-reactive *S*-ethylsulfonyl-DL-cysteïne NCA werd gesynthetiseerd en gepolymeriseerd volgens analogie met de enantiomerisch zuivere *S*-ethylsulfonyl-L-cysteïne. Met de racemische NCA was het mogelijk om volledige monomeer

transformatie te bereiken en dus ketenlengtes tot $X_n = 102$ te synthetiseren, corresponderend met een moleculairgewicht van 20.0 kDa. Bovendien toonde onderzoek van de reactiesnelheid hogere reactiesnelheidsconstanten (gemiddeld 40% sneller), terwijl de reactie nog steeds door het Avrami-model kon worden beschreven, wijzend op een lage oplosbaarheid. Vervolgens was alleen een lagere tendens, maar geen volledige scheiding van de β -platen met infraroodspectroscopie (IR) herkenbaar. Echter, de volledige omzetting van monomeer *S*-ethylsulfonyl-DL-cysteïne NCA maakte de polymerisatie van een triblokcopolymeer mogelijk door het stapgewijs toevoegen van monomeer, die anders ontoegankelijk zou zijn voor het enantiopure aminozuur, tenzij extra opzuivering zou worden geïntroduceerd.

De invloed van de secundaire structuur op de zelf-assemblage van thiol-reactieve copolymeren werd in **hoofdstuk 3** onderzocht. Daarom werd een bibliotheek van copolymeren van enantiomere zuivere polysarcosine-*blok*-poly(*S*-ethylsulfonyl-L-cysteïne) (pSar-*b*-p(L)Cys(SO₂Et)), racemisch pSar-*b*-p(DL)Cys(SO₂Et), en pSar-*b*-poly(*S*-ethylsulfonyl-L-homocysteïne) (pSar-*b*-p(L)Hcy(SO₂Et)) gesynthetiseerd. De secundaire structuurvorming van de polypeptiden werd geanalyseerd door IR en circulaire dichroïsmespectroscopie, waarbij een α -helix werd gedetecteerd voor pSar-*b*-p(L)Hcy(SO₂Et), antiparallele β -platen voor pSar-*b*-p(L)Cys(SO₂Et), en verstoorde β -platen voor racemisch pSar-*b*-p(DL)Cys(SO₂Et). Gedurende zelfassemblage geïnduceerd door oplosmiddel wisseling, toonden de antiparallele β -platen de sterkste neiging tot zelfassemblage, gevolgd door het α -helix copolymeer en als laatste de verstoorde β -platen, zoals gekwantificeerd werd door dynamic light scattering (DLS). Deze resultaten werden verder zichtbaar toen de structuren werden geanalyseerd via atoomkrachtmicroscopie (AFM) of transmissie-elektronenmicroscopie (TEM), waarbij wormachtige, volledig ronde of enigszins langwerpige vormen zichtbaar waren. Secundaire structuurvorming van thiol-reactieve copolymeren is dus een elegant instrument om de kenmerken van nano-geneesmiddelen aan te passen.

In **hoofdstuk 4** werd de cross-linkingsdichtheid als parameter beoordeeld om de stabiliteit van CCPMs gebaseerd op pSar-*b*-p(L)Cys(SO₂Et)_n te verfijnen. Om structuur-activiteit relaties te definiëren werden de lengtes van het te cross-linken p(L)Cys(SO₂Et)_n blok geselecteerd op $X_n = 17$ of 30, en mono-, bi-, of trifunctionele thiol-reagentia werden gesynthetiseerd en toegepast om de *S*-ethylsulfonyl groep aan te pakken voor uitdovings of cross-linkingsreacties. Als screeningstechnieken werden asymmetrische flowveld-flow fractionering (AF4)

en fluorescentie correlatiespectroscopie (FCS) toegepast. Hierbij toonde de AF4 analyse in menselijk bloedplasma en eenduidige connectie tussen de cross-linkingsdichtheid en de stabiliteit van de polymere micellen. Grote fracties van aggregaten werden gevonden voor niet-gecrosslinkte micellen en nog steeds voor CCPMs van de bi-functionele cross-linkers en $X_n = 17$, maar niet wanneer de tri-functionele peptide cross-linker werd toegepast. Evenwel, volgens de analyse van de bloed circulatiehalfwaardetijd of biodistributie na intraveneuze toediening aan muizen was geen onderscheid tussen de verschillende nanodeeltjes mogelijk, waarbij een halfwaardetijd van 11.3 - 19.1 h voldoende stabiliteit aangaf voor medicijnafgifte via passieve targeting mechanismen.

Om een grootschalige productie van CCPMs mogelijk te maken werd in **hoofdstuk 5** een continu productieproces ontwikkeld en een strategie gepresenteerd om deze CCPMs onafhankelijk van de synthese stimuli-responsief met APIs te beladen. De zelf-assemblage en de cross-linking van micellen gebaseerd op pSar-*b*-p(L)Cys(SO₂Et) met dihydrolipoïnezuurhydrazide werd aangepast voor de productie middels spleet-interdigitale micromixers. Met geoptimaliseerde proces parameters was het mogelijk om tot 650 mg CCPMs/h met een enkel instrument te produceren. Verder werden deze CCPMs gezuiverd door online tangentiële flowfiltratie, waarbij het aandeel van ongeconjugerd polymer onder de detectie limit blijft ($\leq 0.5\%$). In een volgende stap werden deze CCPMs met paclitaxel-levulinezuur geladen (PTX@CCPMs), waardoor stimuli-responsieve afgifte van de API bij endo-lysosomale pH-waarden mogelijk was. Wanneer getest in celkweek- en xenograft B16F1 zebrawislarvenmodellen, vertoonden PTX@CCPMs vergelijkbare prestaties maar verminderde toxiciteit in vergelijking met state-of-the-art behandeling met paclitaxel, geformuleerd als albumine-gebonden nanodeeltjes (nab-paclitaxel). In conclusie kan de gepresenteerde strategie de CCPM-productie eenvoudiger en robuuster maken, waardoor gescreend kan worden op combinatietherapiën.

In **hoofdstuk 6** werden polypept(o)ides gecombineerd met fotoresponsieve ruthenium(II)-complexen als op metaal gebaseerde APIs om licht als externe stimulans voor medicijnafgifte uit CCPMs te gebruiken. Polypept(o)ides op basis van pSar-*b*-poly(glutaminezuur) (pSar-*b*-pGlu) werden gesynthetiseerd en gemodificeerd met aromatische nitrilgroepen voor de coördinatie van bis(bipyridine)ruthenium(II) ([Ru(bpy)₂]²⁺) of bis(biquinoline)ruthenium(II) ([Ru(biq)₂]²⁺) complexen. Afhankelijk van de flexibiliteit of hydrofobiciteit van de linker werden bolvormige of wormachtige micellen verkregen. De voortgang van

de cross-linkingsreactie kon worden gevolgd via de kleurverandering die voortkomt uit de liganduitwisselingsreactie. De cross-linking had geen invloed op de grootteverdeling, maar resulteerde in stabiele CCPMs volgens GPC in hexafluoroisopropanol (HFIP) en DLS in menselijk bloedplasma. Voor medicijnafgifte konden CCPMs die $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$ bevatten binnen 300 s worden gesplitst, terwijl slechts onvoldoende lichtgeïnduceerde solvolyse werd waargenomen voor $[\text{Ru}(\text{biq})_2]^{2+}$, verwijzend naar lage kwantumopbrengsten en de dichte micellaire kern. De fotoresponsieve CCPMs werden beoordeeld in celkweek en het *in ovo*-model bevestigde een hoge biocompatibiliteit en langdurige vasculaire circulatie die samen de basis vormen voor toekomstig onderzoek voor op metaal gebaseerde APIs met hoge cytotoxiciteit en snelle splitsingsprofielen.

Hoofdstuk 7 was gericht op het beoordelen van precisiegeneeskunde om de heterogene respons te verklaren van hoofd-halskankerpatiënten op therapeutische behandelingen. Daarom werd een cisplatine-resistente hoofd-halskankercellijn bewerkstelligd en gesequenced. Medicijnopname via het ionkanaal LRRC8A werd geïdentificeerd als de moleculaire route voor cisplatineresistentie. De klinische betekenis van LRRC8A als biomarker werd onderzocht onder een cohort van 500 hoofd-halskankerpatiënten met gegevens uit The Cancer Genome Atlas. Voor patiënten die behandeling met cisplatine kregen, correleerden lage niveaus van LRRC8A met een lagere totale overleving. Om de opname van geneesmiddelen onafhankelijk te maken van LRRC8A, werd cisplatine geconjugeerd aan polypept(o)ides van pSar-*b*-pGlu(ONa). De chlorideliganden van cisplatine werden uitgewisseld door de carboxylaatgroepen in de zijketen van glutaminezuur, wat leidde tot kleine bolvormige polymere micellen (NP_{Cis} , $D_h \approx 28$ nm) met een hoge biocompatibiliteit. NP_{Cis} induceerde geen activering van het complementsysteem, colloïdale stabiliteit werd bevestigd door DLS in menselijk bloedplasma en de circulatiehalfwaardetijd van ca. 4 uur in zebravislarven wees op effectieve stabilisatie die de basis vormde voor passieve tumortargeting. In celkweek keerde NP_{Cis} met succes cisplatineresistentie om door het LRRC8A-kanaal te omzeilen, wat het belang bevestigde van het combineren van nanogeneeskunde en moleculaire routes voor selectie van patiënten.

Het therapeutisch potentieel van de cofactor ijzer bij specifieke toediening aan macrofagen werd onderzocht in **hoofdstuk 8**. Ijzeroxide nanodeeltjes (SPIONs) werden ingebed in CCPMs op basis van pSar-*b*-p(L)Cys(SO₂Et). De genoemde bouwstenen werden gecombineerd door cross-linking met dihydrolipoïnezuur

gericht op chemoselectieve disulfidebindingsvorming en coördinatie naar het SPION-oppervlak middels de carboxylaatgroep. De resulterende SPION-CCPMs toonden colloïdale stabiliteit in menselijk bloedplasma en glutathion-responsieve degradatie. In co-culturen van primaire murine macrofagen en Lewis longcarcinoomcellen werden de SPION-CCPMs specifiek door macrofagen opgenomen in een op ijzer gerelateerde feedback-loop manier. De langzame ijzerafgifte van SPION-CCPMs veroorzaakte een sterk ontsteking gerelateerd fenotype in zowel muizen- als menselijke macrofagen. Vervolgens werden significant verhoogde niveaus gedetecteerd van ontstekingachtige oppervlaktemarkers, bijvoorbeeld cluster van differentiatie 86 (CD86) en cytokines zoals tumornecrosefactor α (TNF α) en interleukine 1 β (IL-1 β). De steriele ontsteking van macrofagen werd verder bevestigd *in vivo*, waarbij SPION-CCPMs intratracheal aan muizen toegediend werden. Op basis van het concept van ontwerp-voor-vrijgave kunnen SPION-CCPMs worden geïntroduceerd als een kansrijk adjuvans om pathologische immuuntolerantie te overwinnen en macrofagen in de tumormicro-omgeving te activeren.