Universiteit
Leiden
The Netherlands

Phase separation in lipid-based nanoparticles: exploring the nano-bio interface

Papadopoulou, P.

Citation
Papadopoulou, P. (2023, November 7). *Phase separation in lipid-based nanoparticles: exploring the nano-bio interface*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3656645

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/1887/3656645

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

Samenvatting

Nanomedicijnen gebaseerd op lipiden worden gebruikt als een geavanceerd systeem om medicatie gecontroleerd op de juiste locatie in het lichaam af te leveren. Desalniettemin is er nog veel onbekend hoe deze nanodeeltjes zich gedragen in een biologische omgeving en welke interacties van belang om translatie naar klinische toepassingen mogelijk te maken. Een beter begrip over hoe de samenstelling van nanodeeltjes de fysische eigenschappen beïnvloedt zoals bijvoorbeeld de morfologie en daarmee de interactie met de biologische omgeving kunnen helpen bij de ontwikkeling van efficiënte nanomedicijnen. In dit proefschrift werd de morfologie van lipide nanodeeltjes en de interactie met een biologische omgeving als functie van de lipide structuur onderzocht en dan met name van lipide nanodeeltjes met fase-scheiding. Deze unieke morfologie resulteerde in selectieve nanodeeltje-eiwit interacties en het gebruik maken van endogene biologische systemen voor cel-specifieke aflevering van medicatie *in vivo*. Dit proefschrift beschrijft een fundamentele studie over hoe de samenstelling van lipide deeltjes gebruikt kan worden om het gedrag *in vivo* te controleren, wat kan leiden tot de rationele ontwikkeling van effectieve nanomedicijnen.

Hoofdstuk 1 introduceert het onderzoeksveld van lipide gebaseerde nanomedicijnen. De invloed van lipide structuur op de fysicochemische eigenschappen, het ontwerpen van geoptimaliseerde nanodeeltjes voor medicijnafgifte en een historisch perspectief worden behandeld. De meest recente ontwikkelingen in het veld van nanomedicijnen en hoe een rationele wetenschappelijke benadering kan bijdragen tot nieuwe oplossingen wordt beschreven. Tenslotte wordt de motivatie van dit proefschrift toegelicht.

Hoofdstuk 2 van dit proefschrift beschrijft de ontdekking van de nieuwe liposomale formulering "PAP3", welke bestaat uit een mengsel van het natuurlijke lipide DSPC en het synthetische diacylglycerol (DAG) analoog, DOaG. Deze formulering bevat geen traditionele cel-specifieke peptiden of antilichamen om celspecificiteit te verkrijgen. PAP3-liposomen accumuleerde specifiek in brein endotheelcellen (bECs) van zebravis embryo's door gebruik te maken van endogene lipide transport- en metabolisme mechanismen, gemedieerd door het enzym triglyceride lipase (TGL). Analyse van deze liposomen met elektronen microscopie in bevroren staat

(Cryo-TEM) liet zien dat deze deeltjes een unieke fase-gescheiden morfologie hebben waarbij een DOaG rijke druppel zich bevindt in een bilaag van DSPC. Deze studie toonde aan dat deze morfologie verantwoordelijk was voor de selectieve *in vivo* accumulatie. Deze studies werden uitgevoerd in zebravis embryo's om in detail de specifieke opname van de nanodeeltjes te relateren aan de zogenaamde "nano-bio interface". Deze embryo's hebben een hoge metabolische vraag naar lipiden en daarom een hoge expressie van endotheel- en lipoproteïne lipase (EL en LPL), voornamelijk in de bloedvaten van het brein. In de aanwezigheid van de lipase inhibitor XEN445 werden de lipases geinhibiteerd resulterend in een verlies van celspecificiteit. Het voorgestelde mechanisme en de rol van TGL voor deze bevindingen werd bevestigd met additionele studies in muizen.

Hoofdstuk 3 werd het mechanisme van celspecificteit en de rol van TGL's en fasescheiding verder bestudeerd. Door gebruik te maken van een combinatie van cryo-TEM, massa spectrometrie, enzym analyse en moleculaire dynamische (MD) simulaties, werd aangetoond dat de morfologie van liposomen van verandert na interactie met lipases. Tevens werd aangetoond dat het gebruik van het lipide DOaG in deze liposomen resulteerde in membranen met zogenaamde lipide 'packing defects', dit zijn domeinen in het lipide membraan waarbij de afstand tussen fosfolipiden vergroot is wat leidt tot contact van water met de hydrofobe delen van het membraan in DOaG-rijke domeinen. Tevens werd aangetoond dat de zogenaamde "tryptophane-loop" in lipases verantwoordelijk is voor de binding aan de PAP3-liposomen. Hierdoor gedraagt het enzym zich als een sensor voor de genoemde "packing defects", waardoor TGL's voorkeur hebben om fase-gescheiden liposomen te binden wat de *in vivo* celspecificteit verklaart.

Hoofdstuk 4 beschrijft een uitvoerig onderzoek betreffende de moleculaire principes achter de fase-scheiding en selectieve binding aan bEC's *in vivo*, geïnduceerd door DOaG in liposomale membranen. Varianten van DOaG werden gesynthetiseerd waarna de structuur-functie relatie onderzocht werd. Met behulp van een combinatie van Cryo-TEM analyse van de nanodeeltjes en biodistributiestudies in zebravis embryo's werd duidelijk dat DOaG-analoga met medium-lengte onverzadigde koolstofketens (C16:1, C18:1) in combinatie met DSPC nodig waren om fase-scheiding te induceren, welke noodzakelijk was om liposomen te verkrijgen die selectieve binden aan bEC's in zebravissen. DOaG analoga met verzadigde koolstofketens vertoonden niet deze celspecificiteit. DOaG

analoga met lange koolstofketens (C20:1, C24:1) gemengd met DSPC bleken geen stabiele liposomen te vormen. Fasescheiding in liposomen werd waargenomen voor DOaG analoga/DSPC mengsels, maar dit resulteerde niet in selectieve bEC accumulatie. Het gebruik van alleen het sn-1,3 isomeer van DOaG verhoogde de stabiliteit van de PAP3 liposomen. De stabiliteit van liposomen werd ook verhoogd na pegylering of wanneer DOaG variant (C16:1) gemengd werd met DSPC en deze formuleringen konden ook gevormd worden in PBS met behoud van gemiddelde grootte en lage polydispersiteit.

De in hoofdstuk 2-4 beschreven fase-scheiding in DOaG/DSPC liposomen resulterend in bEC-selectiviteit is ook van interesse voor andere lipide-gebaseerde nanodeeltjes. **Hoofdstuk 5** laat de toepasbaarheid zien van DOaG in mRNA gebaseerde lipide nanodeeltjes (LNPs) en dient als 'proof-of-concept' voor de toepassing van DOaG in LNPs om zo celspecifieke mRNA-afgifte te verkrijgen. In deze studie werden vier mRNA-LNP formuleringen gemaakt en getest in zebravis embryo's. Fase-gescheiden mRNA-LNP's die DOaG bevatten, in combinatie met het ioniseerbare lipide DODAP, werden succesvol geformuleerd met een goede mRNA encapsulatie-efficientie. Deze formulering liet specifieke opname en expressie zien in de bECs van de zebravis embryo's.

Hoofdstuk 6 vat alle bevindingen van dit promotieonderzoek samen en geeft suggesties voor toekomstig onderzoek en toepassingen.

Appendix I beschrijft een gemodificeerd protocol voor de *in-situ* formatie en encapsulering van goud nanodeeltjes in fase-gescheiden DOaG-DSPC liposomen.