



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).

Περίληψη

Τα λιπιδικά νανοσωματίδια είναι κλινικά τα πιο προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Ωστόσο, η περιορισμένη κατανόηση των ιδιοτήτων αυτοδόμησης τους και των βασικών νανο-βιο-αλληλεπιδράσεων εμποδίζει την μετάφρασή τους κλινικά, η οποία βασίζεται κυρίως σε προσεγγίσεις δοκιμής-σφάλματος και εντατικούς εμπειρικούς ελέγχους. Επομένως, η εξέλιξη νανολιπιδικών στοχευμένων θεραπειών απαιτεί πληρέστερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η λιπιδική σύσταση καθορίζει τη μορφολογία και οδηγεί σε (επιθυμητές) νανο-βιο-αλληλεπιδράσεις. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η χημεία των λιπιδίων, η σύσταση και η νανοσωματιδιακή μορφολογία, συσχετίζονται για να παρέχουν μια ολοκληρωμένη εικόνα καινοτόμων λιπιδικών νανοσωματιδίων διαχωρισμένης φάσης, με εξειδικευμένη συμπεριφορά στη νανο-βιο διεπαφή. Η εξειδικευμένη αυτή συμπεριφορά χαρακτηρίζεται από την εκλεκτική αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων-πρωτεϊνών και τη προσπέλαση ενδογενών βιολογικών μηχανισμών για κυτταρική εξειδίκευση *in vivo*. Οι πληροφορίες που παρέχονται σε αυτή τη διατριβή διευρύνουν τις τρέχουσες, θεμελιώδεις γνώσεις σχετικά με την αυτοδόμηση λιπιδικών νανοσωματιδίων και την *in vivo* συμπεριφορά τους, θέτοντας τις βάσεις για τον ορθολογικά βελτιστοποιημένο σχεδιασμό τους.

Στο **Κεφάλαιο 1** παρουσιάζεται ο τομέας της νανοϊατρικής βασιζόμενος σε λιπιδικά νανοσωματίδια, εξηγώντας τις μοριακές αρχές των λιπιδίων, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, την αρχιτεκτονική των λιπιδικών νανοσωματιδίων, ενώ αναφέρεται και η ιστορική ανάδρομή της εξέλιξης τους. Επιπλέον, συζητούνται ενδελεχώς οι πρόσφατες εξελίξεις στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων στο τομέα αυτό, μαζί με τις υπάρχουσες προκλήσεις, και παρουσιάζονται διάφορες επιστημονικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπισή τους. Τέλος, παρουσιάζονται οι βλέψεις και το κίνητρο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στο **Κεφάλαιο 2** της διατριβής, περιγράφεται η ανακάλυψη ενός καινοτόμου είδους λιποσωμάτων (αναφερόμενα ως PAP3), που αποτελείται από δύο μόνο λιπίδια - το φυσικό φωσφολιπίδιο DSPC και το συνθετικό ανάλογο διακυλογλυκερόλης (DAG) DOaG - χωρίς τη χρήση κοινώς χρησιμοποιούμενων παραγόντων στόχευσης, π.χ. αντισώματα ή πεπτίδια. Το λιπόσωμα αυτό είναι ικανό να συσσωρεύεται επιλεκτικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου εμβρύων ζεβρόψαρων, προελαύνοντας ένα μονοπάτι μεταφοράς λιπιδίων και λιπιδικού μεταβολισμού, με τη μεσολάβηση της τριγλυκεριδικής λιπάσης (TGL). Η απεικόνιση με κρυοηλεκτρονική

μικροσκοπία διέλευσης (cryo-TEM) αποκάλυψε μια νέα μορφολογία λιποσωμάτων που χαρακτηρίζεται από διαχωρισμό φάσης λιπιδίων, παρουσία ενός λιπιδικού σταγονιδίου πλούσιου σε DOaG εντός της διπλοστιβάδας DSPC, το οποίο βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνο για την επιλεκτική στόχευση. Τα έμβρυα ζεβρόψαρα χρησιμοποιήθηκαν ως το πρωτογενές μοντέλο *in vivo* για την αποσαφήνιση του βιολογικού μηχανισμού που υποστηρίζει τη επιλεκτική νανοσωματιδιακή στόχευση εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, τα έμβρυα ζεβρόψαρα έχουν υψηλές απαιτήσεις σε λιπίδια και ως εκ τούτου οι ενζυμικές λιπάσες, όπως η ενδοθηλιακή (EL) και η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), έχουν έντονη παρουσία στην περιοχή του κεφαλιού των ζεβρόψαρων. Πράγματι, παρουσία ενός μικρού μορίου αναστολέα λιπάσης (XEN445), η στόχευση των λιποσωμάτων στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτράπηκε. Ομοίως, όταν ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο *in vivo* μελέτης, η συμμετοχή της TGL στην πρόσληψη βρέθηκε επίσης ότι συντηρείται (μερικώς), παρόλαυτα σε διαφορετικό ιστό (ήπαρ).

Στο **Κεφάλαιο 3** περιγράφεται μια εις βάθος μηχανιστική κατανόηση των μεταβολών σύστασης και μορφολογίας που υφίστανται τα διαχωρισμένα σε φάση λιποσώματα παρουσία TGL. Συνδυάζοντας διαφορετικές τεχνικές π.χ., cryo-TEM, φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), ενζυματική ανάλυση και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD), αποκαλύφθηκε ότι τα λιποσώματα υφίστανται αναδιαμόρφωση μετά από αλληλεπίδραση λιποσώματος-λιπάσης. Επίσης, ο διαχωρισμός φάσης λόγω DOaG, βρέθηκε ότι έχει ως αποτέλεσμα μεμβράνες με ελαττώματα στο πακετάρισμα των λιπιδίων τους - περιοχές όπου η απόσταση των παρακείμενων φωσφολιπιδίων είναι αυξημένη - εκθέτοντας υδρόφοβα τμήματα πλούσια σε DOaG στο υδατικό περιβάλλον. Αυτά τα ελαττώματα διευκολύνουν τη σύνδεση της TGL στην επιφάνεια του λιποσώματος με αποτέλεσμα την υδρόλυση του DOaG. Αποδείχθηκε επίσης ότι η φυσική περιοχή δέσμευσης λιποπρωτεϊνών του ενζύμου – που είναι πλούσια σε τρυπτοφάνες - δρα ως αισθητήρας αυτών των ελατωμάτων, υπονοώντας ότι η TGL δεσμεύεται κατά προτίμηση σε μεμβράνες διαχωρισμένης φάσης, σε σύγκριση με επίπεδες λιπιδικές μεμβράνες.

Στο **Κεφάλαιο 4** περιγράφεται μια εμπεριστατωμένη διερεύνηση των υποκείμενων μοριακών αρχών που υποστηρίζουν τον διαχωρισμό φάσης και την επιλεκτική *in vivo* στόχευση, όπως αυτά προκύπτουν από το DOaG σε λιποσωματικές μεμβράνες. Μια βιβλιοθήκη μοριακών αναλόγων DOaG με ποικίλες μοριακές ιδιότητες συντέθηκε και διερευνήθηκε η σχέση μοριακής δομής-λειτουργίας. Οι μελέτες cryo-

TEM και βιοκατανομής σε έμβρυα ζεβρόψαρα αποκάλυψαν ότι μεσαίου μεγέθους (C16:1, C18:1), μη κορεσμένες λιπιδικές αλυσίδες ήταν απαραίτητες για να προκληθεί διαχωρισμός φάσης στα λιποσώματα - όταν τα ανάλογα DOaG συνδυάζονταν με DSPC - και να επιτευχθεί επιλεκτική *in vivo* στόχευση. Αντίθετα, πλήρως κορεσμένα μοριακά ανάλογα DOaG δεν σχημάτισαν λιποσώματα. Ανάλογα που περιείχαν τις (μακρές) ακυλικές αλυσίδες C20:1 ή C24:1, αναμειγμένα με DSPC, σχημάτισαν λιποσώματα αν και με υψηλή αστάθεια, ή δεν σχημάτισαν καθόλου λιποσώματα, αντίστοιχα. Παραδόξως, το ανάλογο με μικρή ακυλική αλυσίδα (C14:1) προκάλεσε διαχωρισμό φάσης στις μεμβράνες DSPC, αλλά τα ανακλύπτοντα λιποσώματα δεν στόχευαν τα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, αξιολογώντας την επίδραση των μιγμάτων *sn*-ισομερών του DOaG ως προς τη σταθερότητα των λιποσωμάτων, βρέθηκε ότι το DOaG που παρουσιάζεται στο καθαρό ισομερές *sn*-1,3, βελτιώνει τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα των λιποσωμάτων PAP3. Επιπλέον, η πεγκυλίωση και η αναντιστοιχία μήκους ακυλικής αλυσίδας μεταξύ DSPC (C18:0) και αναλόγου DOaG (C16:1) βελτίωσαν τη σταθερότητα και την ικανότητα αυτοδόμησης των λιποσωμάτων σε PBS με αποδεκτές τιμές PDI και μεγέθους.

Το Κεφάλαιο 2-4 αναδεικνύει ότι ο διαχωρισμός φάσης που προκαλείται από τα DOaG λιπίδια είναι μια νέα, λειτουργική μέθοδος στόχευσης *in vivo*, η οποία μπορεί να είναι ενδιαφέρουσα και για άλλα συστήματα λιπιδικών νανοσωματιδίων. Στο **Κεφάλαιο 5** παρουσιάζεται τη δυνατότητα εφαρμογής του λιπιδίου DOaG σε συνθέσεις λιπιδικών νανοσωματιδίων που ενθυλακώνουν mRNA (mRNA-LNP) και χρησιμεύει ως απόδειξη της ιδέας για τη χρήση του DOaG σε LNP για την επίτευξη εξειδικευμένης στόχευσης κυττάρων και μεταφοράς mRNA. Σε αυτή τη μελέτη, δημιουργήθηκαν τέσσερα σκεύασμα mRNA-LNP και αξιολογήθηκε η *in vivo* συμπεριφορά τους σε έμβρυα ζεβρόψαρα. Ένα διαχωρισμένης φάσης mRNA-LNP που περιείχε DOaG, σε συνδυασμό με το ιονιζόμενο λιπίδιο DODAP, διαμορφώθηκε επιτυχώς ενθυλακώνοντας επαρκή ποσότητα mRNA. Αυτό το σκεύασμα βρέθηκε να στοχεύει και να συσσωρεύεται εκλεκτικά στα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα εμβρύων ζεβρόψαρων, με αποτέλεσμα την μεταφορά mRNA και την έκφραση πρωτεΐνης.

Το **Κεφάλαιο 6** περιλαμβάνει τη σύνοψη όλων των κύριων ευρημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας και υπογραμμίζει τη σημασία τους για μελλοντικές μελέτες και εφαρμογές.