



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Nanoparticle-based combination drug delivery systems for effective cancer treatment

He, Y.

### Citation

He, Y. (2024, June 25). *Nanoparticle-based combination drug delivery systems for effective cancer treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3765914>

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/1887/3765914>

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

# Chapter 8

## Summary



## Summary in English

The current direction of research in cancer treatment is moving towards a multidisciplinary crossover and multi-purpose combination approach. The rise of nanotechnology offers the possibility of creating versatile therapeutic platforms capable of controlling drug release, reducing drug resistance and side effects, and targeting tumors or immune cells. However, cancer treatment still faces many problems, such as uneven drug distribution and high toxicity of multi-drug combinations. How to increase the dose of drugs at the tumor site while reducing the systemic toxicity of chemotherapeutic drugs is area topic of current research. Rare earth elements have good optical properties and the combination of rare earth elements with chemotherapeutic agents through nanocarriers opens the way for tracking the distribution of nanodrugs. Cancer does not occur in isolation; during tumor development, various pro- and anti-tumor cells are recruited around the tumor tissue, thus forming a TME. Exploiting the characteristics of TME by reprogramming the functions of pro-tumor TAMs and CAFs in the TME to inhibit the activity of the body's pro-tumor mechanisms and activate or enhance its anti-tumor response is a promising strategy for the treatment of cancer today.

### EGF-modified PLGA-lanthanide nanoplatform for combined NIR-II cancer imaging and targeted drug delivery

In **Chapter 2**, we synthesized  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}$  NPs by reacting rare earth elements  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$  with  $\text{CaF}_2$  through a hydrothermal process. They can be used as fluorescent probes for biological imaging. In order to track the drug distribution, multifunctional NPs ( $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}+\text{DOX} @ \text{PLGA/PEG/EGF}$  NPs) were synthesized using PLGA-PEG as the transport platform,  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}$  NPs and chemotherapeutic drugs (DOX) as the core and EGF as the ligand. By analyzing the experimental results, we found that PLGA/PEG/EGF NPs containing  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}$  NPs can fluoresce strongly at the second biological window (900–1200 nm) even under 808 nm laser excitation, which indicates that  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}$  NPs have independent spectra and binding to PLGA/PEG/EGF does not affect their high penetration. The results demonstrate the great potential of these versatile NPs as *in vivo* imaging probes. In addition, we found that EGF slowed the release rate of DOX from the multifunctional NPs, resulting in a longer release time of DOX. This suggests that this drug delivery system could reduce the systemic toxicity of chemotherapeutic drugs by slowing the rate of drug release. There was no cytotoxicity in the control  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd} @ \text{PLGA/PEG/EGF}$  NPs, indicating that DOX in  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}+\text{DOX} @ \text{PLGA/PEG/EGF}$  NPs was the main component of apoptosis induction. In summary,  $\text{CaF}_2:\text{Y Nd}+\text{DOX}$

@ PLGA/PEG/EGF NPs not only can effectively target tumor cells, but also can be used as fluorescent probes to track NPs by NIR-II fluorescence imaging, which holds great promise for future applications in synergistic therapy, tracing and imaging.

### **Functionalized Nanoparticles Targeting Tumor-Associated Macrophages as Cancer Therapy**

The complex and diverse TME poses a great difficulty in the treatment of tumors. TAMs and CAFs, as the major cell populations in TME, are heterogeneous and plastic, and play a pivotal role in promoting tumor proliferation, migration and immunosuppression. TAMs have multiple phenotypes, such as tumor-promoting M2 TAMs and anti-tumor M1 TAMs, which are variable and can be reprogrammed from M2 to M1 under certain conditions. Immunotherapies targeting TAMs to reduce immunosuppression and targeted therapies targeting CAFs to inhibit its tumor promotion have recently become a hot topic of research. In **Chapter 3**, we provide an overview of the impact of TME and TAMs polarization on cancer therapy; review the therapeutic options for targeting TAMs in recent years, highlight the therapeutic strategies, research advances and some limitations of targeting and reprogramming TAMs based on NPs. Finally, we compare the strategies of different types of NPs targeting TAMs and analyze their potential application in cancer therapy.

### **Multifunctional Role of Lipids in Modulating the Tumorigenic Properties of 4T1 Breast Cancer Cells**

Lipid metabolism in the TME is a key regulator of TAMs and tumor cell interactions and can modulate tumor immune responses in TAMs. However, the exact mechanism of action of lipids is unclear. In **Chapter 4**, we analyzed the effects of PA, SM, Cer and DHA on TAMs polarization and breast cancer cell proliferation. The results show that lipids not only inhibit the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells but also reduce the pro-tumorigenic properties of M2 macrophages. Comparing the four lipids, we found that the anti-tumor effect of PA was outstanding, as it induced apoptosis in cancer cells without affecting the activity of healthy cells. To more visually analyze the effect of lipids on the pro-tumorigenic properties of TAMs, we used co-culture. The results showed that breast cancer cells co-cultured with M2 cells had an enhanced ability to migrate. When lipids were added, tumor-promoting M2 macrophages were converted to anti-tumor M1-type macrophages to varying degrees. The effects of Cer and PA were more

prominent. Taken together, the experimental results highlight the great potential of lipids in inhibiting tumor development and promoting TAMs reprogramming.

### **Effective breast cancer therapy based on palmitic acid-loaded PLGA nanoparticles**

With the advancement of TME research, immunotherapy represented by reprogramming M2 type macrophages by targeting TAMs has received increasing attention. Previous *in vitro* studies have demonstrated that PA is not only effective in inhibiting the proliferation and migration of breast cancer cells, but also has the potential to reprogram M2 macrophages. However, PA is a saturated fatty acid and is extremely insoluble in water. In **Chapter 5**, in order to overcome these limitations and enhance the body's anti-tumor immune response, we used PLGA as a carrier to encapsulate PA and DOX into NPs via a double emulsion method. *In vitro* studies confirmed that PLGA-PA-DOX NPs and PLGA-PA NPs significantly inhibited the migration and proliferation of 4T1 cells. The PLGA-PA NPs induced reprogramming of TAMs, i.e. M2 macrophages were reprogrammed to M1 macrophages. *In vivo* studies showed that NPs not only significantly inhibited the proliferation, invasion and drug resistance of breast tumors, but also promoted the expression of apoptotic genes in cancer cells. Moreover, PLGA-PA NPs and PLGA-PA-DOX NPs had similar anti-tumor effects. Notably, the PA-containing NPs were able to enhance lymphocyte infiltration within the tumor tissue, implying that PA can modulate the immune response in the TME and that PA plays a positive role in treating breast cancer and enhancing the tumor immune response. In conclusion, this study has shown that NPs loaded with DOX, a chemotherapeutic agent, and PA, an immunomodulatory agent, not only modulate the immune response in the TME but also kill tumor cells more effectively, which may provide a new approach to the treatment of breast cancer.

### **Application of Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles targeting both tumor cells and cancer-associated fibroblasts on human skin equivalents mimicking melanoma and cutaneous squamous cell carcinoma**

CAFs, one of the major components of the TME, is abundant in melanoma and cSCC and is critical in promoting proliferation, metastasis and multi-drug resistance in both melanoma and cSCC. In **Chapter 6**, to explore the effects of the presence of CAFs on both types of skin cancer, full thickness models (FTM) of cSCC and melanoma containing CAFs were prepared and the effects of both topical and

intradermal administration on treatment efficacy were compared. In order to reduce the toxicity of chemotherapeutic agents and to better control the release of chemotherapeutic agents, DOX@PLGA NPs were prepared by a compound emulsion method using PLGA as a vehicle that can penetrate skin tissue without causing serious side effects. FTM data showed that DOX@PLGA NPs significantly inhibited the development of solid tumors. Comparing the two modes of administration, we found that DOX@PLGA NPs inhibited solid tumor invasion, proliferation and promoted apoptosis of cancer cells. The activation of CAFs was also inhibited, and the effect was more pronounced with the local administration. In conclusion, DOX@PLGA NPs effectively inhibited the proliferation and invasion of cancer cells both at the 2D single cell level and within the 3D skin model containing CAFs. The results of this study not only provide a basis for the use of FTM as a skin cancer model, but also provide a reference for the use of nanotechnology for the treatment of skin cancer through topical delivery.

## Nederlandse samenvatting

Het onderzoek in de behandeling van kanker ontwikkelt zich in de richting van een cross-over tussen verscheidene disciplines en een veelzijdige combinatiebenadering in behandeling. De opkomst van nanotechnologie biedt de mogelijkheid om veelzijdige therapeutische platforms te creëren. Nanogeneeskunde is veelbelovend en ontwikkelt zich snel, met name wat betreft het controleren van de afgifte van medicijnen, het verminderen van resistentie tegen behandelingen en hun bijwerkingen, en het targeten van tumoren en immuuncellen. De huidige behandeling van kanker kent forse beperkingen, zoals de ongelijke verdeling van geneesmiddelen over het lichaam en de hoge toxiciteit die veroorzaakt wordt door de combinatie van meerdere geneesmiddelen tegelijkertijd. Momenteel is een belangrijk focus van onderzoek op het gebied van oncologische behandelingen het verhogen van de dosis van geneesmiddelen op de plaats van de tumor worden terwijl tegelijkertijd de systemische toxiciteit van chemotherapeutische geneesmiddelen worden verminderd. Zeldzame aardelementen hebben goede optische eigenschappen en de combinatie van zeldzame aardelementen met chemotherapeutische middelen via nanocarriers maken het mogelijk om de distributie van nanodrugs te volgen. Kanker ontstaat niet in isolement; tijdens de ontwikkeling van een tumor worden verschillende pro- en anti-tumorcellen gerekruteerd rond het tumorweefsel, waardoor een tumor micro-omgeving (Tumor Micro Environment, TME) wordt gevormd, en een belangrijke mogelijke strategie in de behandeling van kanker is om de kenmerken van het TME te benutten door de functies van pro-tumor tumor geassocieerde macrofagen (TAMs) en kanker geassocieerde fibroblasten (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) in het TME te herprogrammeren met als doel de pro-tumormechanismen van het lichaam te remmen en de eigen anti-tumorrespons te activeren of te versterken.

## EGF-gemodificeerd PLGA-lanthanide nanoplatform voor gecombineerde NIR-II kankerbeeldvorming en gerichte medicijnafgifte

In **hoofdstuk 2** hebben wij  $\text{CaF}_2\text{:Y Nd}$  NP's gesynthetiseerd door de zeldzame aardelementen  $\text{Y}^{3+}$  en  $\text{Nd}^{3+}$  te laten reageren met  $\text{CaF}_2$  via een hydrothermisch proces. Deze NPs kunnen worden gebruikt als fluorescerende probes voor biologische beeldvorming. Om de distributie van geneesmiddelen te volgen, werden multifunctionele NP's ( $\text{CaF}_2\text{:Y Nd+DOX @ PLGA/PEG/EGF}$  NP's) gesynthetiseerd met PLGA-PEG als transportplatform,  $\text{CaF}_2\text{:Y Nd}$  NP's en chemotherapeutische geneesmiddelen (DOX) als kern van deze NPs en EGF als het ligand. We vonden daarbij dat PLGA / PEG / EGF NPs die  $\text{CaF}_2\text{:Y, Nd}$  NPs



bevatten sterk kunnen fluoresceren op het tweede biologische venster (900–1200 nm), zelfs als ze geëxciteerd worden met een laser op 808 nm, wat aangeeft dat CaF<sub>2</sub>: Y, Nd NPs onafhankelijke spectra hebben en hun binding aan PLGA / PEG / EGF niet hun hoge penetratie aantast. De resultaten tonen het grote potentieel aan voor het gebruik van deze veelzijdige NPs als *in vivo* imaging probes. Bovendien konden we uit de resultaten afleiden dat EGF de afgiftesnelheid van DOX uit de multifunctionele NP's vertraagde, wat resulteerde in een langere afgiftetijd van DOX. Dit suggereert dat dit systeem voor het toedienen van geneesmiddelen de systemische toxiciteit van chemotherapeutische geneesmiddelen kan verminderen door de uitgifte van het geneesmiddel te vertragen. Er was geen cytotoxiciteit in de controle CaF<sub>2</sub>:Y, Nd@ PLGA/PEG/EGF NP's, wat erop wijst dat DOX in CaF<sub>2</sub>:Y, Nd+DOX@ PLGA/PEG/EGF NP's het belangrijkste component van apoptose-inductie was. Kortom, CaF<sub>2</sub>:Y Nd+DOX @ PLGA/PEG/EGF NP's kunnen zich niet alleen effectief tumorcellen targeten, maar kunnen ook worden gebruikt als fluorescerende probes om NP's te volgen door middel van NIR-II-fluorescentiebeeldvorming, wat betekent dat het grote potentie heeft voor toekomstige toepassingen in synergetische therapie, tracing en beeldvorming.

### **Gefunctionaliseerde nanodeeltjes getarget op tumorgeassocieerde macrofagen als kankertherapie**

Het complexe en diverse TME vormt een groot probleem bij de behandeling van tumoren. TAMs en CAFs, de belangrijkste celpopulaties in het TME, zijn heterogeen en plastisch, en spelen een centrale rol bij het stimuleren van tumorproliferatie, migratie en immunosuppressie. TAMs hebben meerdere fenotypen, zoals tumorbevorderende M2 TAMs en anti-tumor M1 TAMs, die variabel zijn en onder bepaalde omstandigheden kunnen worden geherprogrammeerd van M2 naar M1. Immunotherapieën gericht op TAMs die de immunosuppressie verminderen en gerichte therapieën op CAFs die de tumorgroei remmen zijn recentelijk een belangrijk onderwerp van onderzoek geworden. In **hoofdstuk 3**, geven wij een overzicht van de invloed van TME en TAMs polarisatie op kankertherapie, bespreken we de therapeutische opties gericht op het beïnvloeden van TAMs van de afgelopen jaren en beschrijven de therapeutische strategieën, de vooruitgang in recent onderzoek en enkele beperkingen van het targeten en herprogrammeren van TAMs op basis van NP's. Ten slotte vergelijken we de strategieën van verschillende soorten NP's die TAMs targeten en analyseren we hun mogelijke toepassing in kankertherapie.

## Multifunctionele rol van lipiden bij het moduleren van de tumorigene eigenschappen van 4T1 borstkankercellen

Lipidenmetabolisme in de TME is een belangrijke regulator van interacties tussen TAMs en tumorcellen en kan de tumor immuunresponsen in TAMs moduleren. Echter, het exacte werkingsmechanisme van lipiden is nog onduidelijk. In **hoofdstuk 4** analyseerden we de effecten van PA, SM, Cer en DHA op TAM-polarisatie en de proliferatie van borstkankercellen. Uit de resultaten blijkt dat lipiden *niet alleen* de proliferatie, migratie en invasie van borstkankercellen remmen, maar ook de pro-tumorigene werking van M2 macrofagen verminderen. Uit een vergelijking van de vier lipiden bleek dat het anti-tumor effect van PA groot was, omdat het apoptose in kankercellen induceerde zonder de activiteit van gezonde cellen aan te tasten. Om het effect van lipiden op de pro-tumorigene eigenschappen van TAMs beter te visualiseren, gebruikten wij een co-cultuur. Uit de resultaten bleek dat borstkankercellen in co-cultuur met M2 cellen een groter vermogen hadden om te migreren. Wanneer lipiden werden toegevoegd, werden tumorbevorderende M2 macrofagen in verschillende mate omgezet in anti-tumor M1-type macrofagen. De effecten van Cer en PA waren prominenter. Samengenomen wijzen de experimentele resultaten op het grote potentieel van lipiden om de ontwikkeling van tumoren te remmen en de herprogrammering van TAMs te bevorderen.

## Effectieve borstkankertherapie op basis van met palmitinezuur geladen PLGA-nanodeeltjes

Door de vooruitgang van onderzoek in de TME, heeft immunotherapie waarbij M2-type macrofagen worden geherprogrammeerd via het beïnvloeden van TAMs steeds meer aandacht gekregen. Eerdere *in vitro* studies hebben aangetoond dat PA *niet alleen* effectief is in het remmen van de proliferatie en migratie van borstkankercellen, maar ook het potentieel heeft om M2 macrofagen te herprogrammeren. PA is echter een verzadigd vetzuur en is zeer onoplosbaar in water. In **hoofdstuk 5** gebruikten we, om deze beperkingen te overwinnen en de anti-tumor immuunrespons van het lichaam te versterken, PLGA als drager om PA en DOX via een dubbele emulsiemethode in NP's in te kapselen. *In vitro* studies bevestigden dat PLGA-PA-DOX NP's en PLGA-PA NP's de migratie en proliferatie van 4T1-cellen significant verminderden. De PLGA-PA NP's induceerden herprogrammering van TAM's, d.w.z. M2 macrofagen werden geherprogrammeerd tot M1 macrofagen. *In vivo* studies toonden aan dat de NP's *niet alleen* de proliferatie, invasie en geneesmiddelenresistentie van

borsttumoren significant remden, maar ook de expressie van apoptotische genen in kankercellen verhoogden. Bovendien hadden PLGA-PA NP's en PLGA-PA-DOX NP's vergelijkbare antitumoreffecten. Opvallend was dat de PA-bevattende NP's de infiltratie van lymfocyten in het tumorweefsel konden verbeteren, wat impliceert dat PA de immunrespons in de TME kan moduleren en dat PA een positieve rol speelt bij de behandeling van borstkanker en het verbeteren van de tumorimmunrespons. In conclusie, deze studie heeft aangetoond dat nanodeeltjes geladen met DOX, een chemotherapeutisch geneesmiddel, en PA, een immunomodulerende lipide, niet alleen de immunrespons in de TME moduleren, maar ook tumorcellen effectiever doden, wat een nieuwe aanpak voor de behandeling van borstkanker kan opleveren.

### **Toepassing van met doxorubicine geladen PLGA-nanodeeltjes die zowel tumorcellen als kankergerelateerde fibroblasten targeten op menselijke huidequivalenten die melanoom en cutaan plaveiselcelcarcinoom nabootsen**

CAFs, een van de belangrijkste componenten van de TME, is overvloedig aanwezig in melanomen en cutaan plaveiselcelcarcinomen (cutaneous squamous cell carcinoma, cSCC) en is van cruciaal belang voor de bevordering van proliferatie, metastase en multi-drugresistentie in zowel melanoom als cSCC. In **hoofdstuk 6** werden, om de effecten van de aanwezigheid van CAFs op beide soorten huidkanker te onderzoeken, volledige dikte (Full thickness models, FTM) van cSCC en melanoom met CAFs voorbereid en werden de effecten van zowel topische als intradermale toediening op de effectiviteit van de behandeling vergeleken. Om de toxiciteit van chemotherapeutische geneesmiddelen te verminderen en de afgiftesnelheid van chemotherapeutische middelen beter te controleren, werden DOX@PLGA NP's bereid via een samengestelde emulsiemethode met PLGA als middel dat door huidweefsel kan dringen zonder ernstige bijwerkingen te veroorzaken. Uit FTM-gegevens bleek dat DOX@PLGA NP's de ontwikkeling van vaste tumoren significant remden. Bij vergelijking van de twee toedieningswijzen bleek dat DOX@PLGA NP's de invasie en proliferatie van vaste tumoren remden en de apoptose van kankercellen bevorderden. De activering van CAFs werd ook geremd, en dit effect was duidelijker merkbaar bij lokale toediening. In conclusie, DOX@PLGA NP's remden effectief de proliferatie en invasie van kankercellen, zowel op 2D single cell niveau als binnen het 3D-huidmodel dat CAFs bevat. De resultaten van deze studie vormen niet alleen een basis voor het gebruik van FTM als huidkankermodel, maar bieden ook een referentie voor het gebruik van nanotechnologie voor de behandeling van huidkanker via topische toediening van geneesmiddelen.