

University of Groningen

## Liposome interactions with biological systems: a journey into cells

Yang, Keni

DOI:  
[10.33612/diss.123825197](https://doi.org/10.33612/diss.123825197)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Yang, K. (2020). *Liposome interactions with biological systems: a journey into cells*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.123825197>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## Nederlandse samenvatting

Nanomedicijnen zijn de laatste tientallen jaren steeds verder ontwikkeld, waarbij verscheidene materialen van nano-grootte dienen als platform om geneesmiddelen, genen en andere materialen af te leveren op de juiste bestemming om zo een ziekte te kunnen genezen of te diagnosticeren. Door hun fysisch-chemische eigenschappen en de mogelijkheid deze op verschillende manieren te veranderen, hebben afleversystemen ten opzichte van conventionele geneesmiddelen en diagnostische reagentia vele voordelen. Echter, het blijft moeilijk om nanomedicijnen te kunnen gaan gebruiken in klinische formuleringen, zodat patiënten hier profijt van kunnen hebben. Hoewel er ieder jaar duizenden artikelen over nanomedicijnen worden gepubliceerd, komen er relatief weinig formuleringen op de markt. Veel factoren spelen een rol bij de langzame klinische ingebruikname van nanomedicijnen. Een belangrijk obstakel is de nog steeds onduidelijke interactie tussen nanomaterialen en biologische systemen. In deze context, is het doel van **dit Proefschrift** het ontrafelen van het gedrag van nanomaterialen op cellulair niveau in een complex biologisch milieu en het ontwikkelen van nieuwe strategieën die leiden tot het ontwikkelen van effectievere nanoformuleringen. Als model voor nanomedicijnen worden in dit proefschrift liposomen gebruikt, welke een van de meest gebruikte nanoformuleringen in de kliniek zijn.

Verscheidene belangrijke stappen en barrières zijn betrokken bij de interactie van nanomaterialen met complexe biologische systemen, welke elk een voor een bestudeerd moeten worden. Ten eerste, als nanomaterialen in een biologische omgeving komen, gaan ze onmiddellijk een interactie aan met biologische vloeistoffen. Vele eiwitten en biomoleculen adsorberen op de oppervlakte, deze laag noemen we de "eiwit-corona". Deze corona verandert het gedrag van het nanodeeltje op cellulair niveau. Het is bekend dat de synthetische eigenschappen van nanodeeltjes belangrijke factoren zijn die de samenstelling van de corona beïnvloeden en er komt steeds meer bewijs dat de corona herkend kan worden door specifieke receptoren op de cel. Dit brengt een interessante mogelijkheid om de samenstelling van de corona af te stemmen en daarmee interacties tussen nanomaterialen en cellen te beïnvloeden.

In **Hoofstuk 2**, wordt beschreven hoe een serie liposomen met verschillende oppervlakte eigenschappen wordt gemaakt en geoptimaliseerd door verschillende ratio's van DOPC (een lipide met zwitterionen) en DOPG (een lipide met negatief lading) te mengen. Op deze manier kunnen specifieke corona's in humaan serum gevormd worden en kan het effect van de corona op de interactie van liposomen met de cellen worden bepaald. Het resultaat laat zien dat bij een verandering in de fractie van zwitterionische en geladen lipiden, zowel de hoeveelheid als de identiteit van de meest voorkomende serumeiwitten, die geadsorbeerd worden aan de liposomen, verschillen. Het interessante is dat de verschillende formuleringen ook verschillende kinetische profielen in opname laten zien. Door specifieke eiwitten die veel voorkomen in de corona's van de verschillende liposomen, met de kinetische opname in de cellen te verbinden, worden de kandidaat corona eiwitten geïdentificeerd die geassocieerd kunnen worden met gereduceerde of verhoogde opname door cellen. Vergelijkbare benaderingen kunnen worden gebruikt om samenstellingen van nanomaterialen op een systematische manier af te stemmen zodat een formulering met het gewenste cel-opname gedrag verkregen wordt.

Een andere belangrijke factor m.b.t. de corona-vorming is de biologische vloeistof waar nanomaterialen zich in bevinden. Veel studies hebben laten zien dat subtiele veranderingen in biologische vloeistoffen kunnen leiden tot de vorming van verschillende corona's met hetzelfde nanomateriaal, wat hele verschillende effecten heeft op de cellen. Echter, er is relatief weinig aandacht besteed aan de extra effecten die de aanwezigheid van vrije biomoleculen in deze biologische vloeistoffen hebben.

In **Hoofstuk 3**, worden de interacties van nanomaterialen met biologische systemen bestudeerd door gebruik te maken van verschillende biologische vloeistoffen (in dit geval serumeiwitten van verschillende bronnen). Daarnaast worden de effecten van de coronasamenstelling in relatie tot de aanwezigheid van vrije biomoleculen in de oplossing ontrafeld. Liposomen worden gebruikt als model voor nanomedicijnen en hun opname in medium waar runder of humaan serum aan is toegevoegd, wordt vergeleken. De opname efficiëntie in de twee verschillende media verschilt sterk, zo ook de coronasamenstelling. Echter, als de overmaat aan eiwitten is verwijderd en de verschillende corona-gecoate liposomen worden toegevoegd aan cellen in serum-vrij medium, is de opname van de liposomen vergelijkbaar. Dezelfde

resultaten worden verkregen als de corona-gecoate liposomen geherintroduceerd worden in medium met humaan of runder serum. Hieruit blijkt dat het verschil in opname efficiënties voornamelijk wordt veroorzaakt door de aanwezigheid en als mede de bron van het eiwit wat in overmaat vrij aanwezig is in het medium. Deze resultaten laten duidelijk zien dat de bron van het eiwit de interactie tussen het nanomateriaal en de cel niet alleen beïnvloedt via de eiwitten in de corona maar ook via de vrije eiwitten in de oplossing. Gelijkwaardige effecten gerelateerd aan de eiwitbron moeten worden meegenomen als de werkzaamheid van nanomedicijnen vergeleken gaat worden zowel *in vitro*, *in vivo* als in klinische onderzoeken in mensen.

Nadat de corona gevormd is, worden de nanomaterialen blootgesteld aan biologisch vloeistoffen, daarna hebben ze eventueel een interactie met een celmembraan en in de meeste gevallen gaan ze de cel binnen. Sinds kort krijgen zwitterionische veranderingen steeds meer aandacht om, als een alternatieve strategie voor het gebruik van polyethylene glycol, de eiwit adsorptie te reduceren. Onze vorige resultaten uit Hoofdstuk 2 hebben ook laten zien dat het zwitterionische DOPC-lipide in liposomen leidt tot een lagere eiwitbinding en een verlaagde opname efficiency. Echter, er is nog weinig bekend over het effect van zwitterionische modificaties op het mechanisme wat liposomen gebruiken om de cel binnen te gaan. Daarom wordt in **Hoofdstuk 4** het mechanisme waarmee cellen liposomen opnemen, bestudeerd. Er worden liposomen gebruikt die het zwitterionische DOPC-lipide of het negatief geladen DOPG-lipide bevatten. Het resultaat laat zien dat het blokkeren van belangrijke componenten van verscheidene endocytische routes, een verschillend effect heeft op de opname van zwitterionische en negatieve liposomen. Bijvoorbeeld, remming van clathrin gemedieerde endocytosis reduceert sterk de opname van negatief geladen liposomen, maar heeft bijna geen invloed op de opname van de zwitterionische liposomen. Terwijl, blokkade van de micropinocytose de opname remt met verschillende omvang voor beide type liposomen. Deze resultaten laten zien dat de twee liposomen gebruik maken van verschillende opname routes om de cell binnen te komen. Dus introductie van de zwitterionische modificaties beïnvloedt niet alleen de eiwit adsorptie en opname efficiëntie (Hoofdstuk 2), maar ook het mechanisme waarmee de liposoom door cellen wordt opgenomen (Hoofdstuk 4). Het is duidelijk dat er meer werk gedaan moet worden om erachter te komen hoe

zwitterionische groepen de corona vorming kunnen beïnvloeden en hoe de verschillen in corona leiden tot een verandering in de manier waarop cellen de nanomaterialen herkennen en verwerken.

Na de opname van nanodeeltjes komt de volgende cruciale stap voor een succesvolle aflevering van de geneesmiddelen, het intracellulaire proces, waarbij de nanodeeltjes worden gesorteerd en vervoerd en waarin uiteindelijk het vervoerde geneesmiddel vrij komt. De methodes die tegenwoordig gebruikt worden voor het bestuderen van het vrijkomen van geneesmiddelen, zijn moeilijk te gebruiken in biologische vloeistoffen, of kunnen lastig de hoeveelheid lading bepalen die vrij gekomen is nadat liposomen de cel zijn binnengegaan. Dit wetende, zijn in **Hoofdstuk 5** verschillende methodes gebruikt om te bepalen hoeveel lading er vrijkomt uit de liposomen als de liposomen de cel is binnengegaan. Daarnaast is ook de stabiliteit van de liposomen bestudeerd en de eventuele lekkage van de lading in biologische vloeistoffen. Er is gebruik gemaakt van de model liposomen uit hoofdstuk 4, welke geladen zijn met sulforhodamine B (SRB) om een hydrofiel geneesmiddel, wat gevangen zit in het binnenste van de liposomen, na te bootsen. Het vrijkomen van SRB uit de twee verschillende liposomen in complexe biologische omgevingen wordt hierbij vergeleken. De resultaten laten voor DOPG liposomen een hoge opname efficiëntie en een snelle vrijlating van SRB in de cel zien. Verder verliezen DOPG liposomen een substantieel deel van de SRB-lading wanneer het in contact komt met serum buiten de cel. Daarentegen is de opname efficiëntie vele malen lager voor DOPC-liposomen en het intracellulaire verlies van de lading gaat veel geleidelijker en langzamer. Deze laatste formulering laat ook een hogere stabiliteit zien in een biologische omgeving (blootstelling aan serum), welke waarschijnlijk komt door een lagere eiwit adsorptie. De methodes die in dit hoofdstuk worden beschreven staan toe om ons te richten op tenminste een deel van de beperkingen van simpele vrijlatingsstudies *in vitro*, om zo de liposoom stabiliteit in biologische vloeistoffen en de vrijlatings-kinetiek in de cel te kunnen bestuderen. Afhankelijk van de vereisten voor de specifieke toepassingen kunnen liposomen en andere nanoformuleringen met vergelijkbare methoden worden aangepast om de vereiste balans tussen stabiliteit in serum en de vrijlating van het geneesmiddel te verkrijgen.

In verschillende studies, zoals in de hoofdstukken 2-5 worden beschreven, wordt er geprobeerd om te begrijpen hoe de eigenschappen van de nanomaterialen moeten worden veranderd om de juiste biologische uitkomsten te bereiken. Ondertussen trekt celmembraan nanotechnologie steeds meer interesse als een alternatieve strategie om gebruikt te worden als nanomateriaal die gedefinieerde interacties met biologische systemen aan kan gaan. Acute myeloïde leukemie (AML) is een kankersoort van de myeloïde lijn van de bloedcellen, welke een hoog risico hebben op het niet aanslaan van de behandeling door resistentie tegen het geneesmiddel en het terugkeren van de ziekte. Toenemend bewijs heeft aangegeven dat het micromilieu in het beenmerg, de plek waar de leukemiecellen verblijven, een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling en evolutie van deze ziekte. Het beter begrijpen van de interacties tussen leukemiecellen en hun verblijfplaats kan leiden tot nieuwe strategieën voor de behandeling van deze ziekte. Met dit in gedachten wordt er in **Hoofdstuk 6** celmembraan nanotechnologie gebruikt om celmembraan nanodeeltjes te maken van verschillende leukemie en beenmergcellen, welke als gereedschap gebruikt kunnen worden om de interacties tussen de kankercellen en de stroma te onderzoeken. Procedures om celmembranen te isoleren werden geoptimaliseerd om vervuiling van het cel membraan met de cel compartimenten te voorkomen. Vervolgens werden celmembraan nanodeeltjes gemaakt door synthetische liposomen, welke ook gebruikt zijn in de andere hoofdstukken, te voorzien van celmembraan componenten. Opname van de verschillende nanodeeltjes door stroma en leukemie cellen werd bestudeerd. De celmembraan liposomen worden sneller opgenomen dan de synthetische liposomen en vooral de opname van de uit stroma afkomstige MS-5 celmembraan liposomen is hoog in alle cellen, inclusief in de MS-5 cellen zelf. Dit geeft de mogelijkheid om stroma celmembraan nanodeeltjes niet alleen te gebruiken voor het karakteriseren van de interactie tussen stromacellen en, maar ook voor het ontwikkelen van nieuwe strategieën voor het afleveren van nanomedicijnen aan de juiste cel.

Concluderend, gebruikmakend van liposomen als een nanomedicijn model, heeft **dit proefschrift** als doel het gedrag van nanomaterialen in complexe biologische systemen te onderzoeken om zo potentieel nieuwe strategieën te definiëren die als leidraad kunnen dienen voor de ontwikkeling van nog effectievere

nanoformuleringen. Hoewel meerdere studies nodig zijn om onze kennis nog verder uit te diepen over hoe complex biologische systemen het gedrag van nanomaterialen beïnvloeden, de resultaten gepresenteerd in dit Proefschrift hebben belangrijke aspecten in zulke interacties benadrukt. Het uitbreiden van deze kennis zal helpen om de synthetische eigenschappen van nanomaterialen zo te veranderen dat de gewenste biologische uitkomsten worden verkregen in zowel cellen als in organismen. Dit zal uiteindelijk bijdragen aan de ontwikkeling van efficiënte nanomedicijnen en hun klinische onderzoeken.