

Samenvatting en conclusies

Sinds de ontdekking van het cellulaire RNA interferentie (RNAi) mechanisme, wekte de therapie met kleine interfererende RNA strengen (siRNA) hoge verwachtingen voor de behandeling van een breed scala aan ziekten, waaronder kanker, virale infecties en genetische ziekten. Het voordeel van siRNA als therapeutica bestaat onder meer in het vermogen om 'ongeneeslijke' pathologieën te behandelen die worden gekenmerkt door de overexpressie van specifieke genen, hetgeen door siRNA selectief kan worden onderdrukt. Ondanks de onbetwistbare voordelen voor therapeutisch gebruik, is de klinische vertaling van dergelijke therapeutica gehinderd door de ongunstige in vivo stabiliteit, farmacokinetiek en biodistributie van dergelijke hydrofiele macromoleculaire geneesmiddelen. Om deze problemen het hoofd te bieden werden reeds diverse nanoscopische vectoren ontwikkeld ter bescherming van het siRNA tegen enzymatische afbraak en ter verbetering van diens afgifte overheen de talloze biologische barrières. In dit opzicht werden zowel virale als niet-virale vectoren onderzocht om het siRNA te verpakken en intracellulaire opname te verzekeren. Niet-virale vectoren zijn op de voorgrond getreden als een interessant siRNA toedieningssysteem vanwege hun relatief eenvoudige productie, verhoogde veiligheid en moduleerbare fysicochemische kenmerken in vergelijking met virale alternatieven. Ondanks hun talrijke voordelen wordt de toepassing van niet-virale vectoren voor intracellulaire afgifte van RNA therapeutica nog steeds beperkt door de opstapeling van zowel de drager als het RNA geneesmiddel in endosomale organellen na internalisatie in een doelwitcel. Zelfs voor state-of-the-art nanodragers zal op deze manier slechts een kleine fractie van de geïnternaliseerde siRNA dosis het cytosol bereiken, hetgeen noodzakelijk is voor de siRNA-gemedieerde genetische interferentie. Het merendeel van het opgenomen siRNA zal echter afgebroken worden door de aanwezige nucleasen in lysosomen. Om deze reden worden verschillende strategieën actief onderzocht om de endosomale vrijstelling te verhogen vooraleer versmelting met lysosomen plaatsgrijpt.

In **Hoofdstuk 1** werd een algemene inleiding voorzien in het gebruik van siRNA-gebaseerde therapeutica en een overzicht gegeven van de verschillende soorten niet-virale vectoren die door de jaren werden ontwikkeld om intracellulaire afgifte van siRNA te verhogen. Na het beschrijven van de relevante kenmerken van nanodeeltjes (nanopartikels, NPs) in functie van RNA afgifte alsook enkele gerapporteerde toepassingen, bespraken we de tot dusver gekarakteriseerde endosomale ontsnappingsmechanismen. Vervolgens werden de interacties tussen NPs en cellulaire (endosomale) membranen toegelicht en behandelden we kort de methodologieën die de visualisatie en kwantificatie van deze intracellulaire mechanismen mogelijk maken.

Systemische toediening van NPs is gelimiteerd door hun eerder selectieve opname in bepaalde organen zoals de lever. Echter, lokale toedieningsroutes kunnen verschillende voordelen bieden om ook andere weefsels te bereiken (bv. gebruik van een lagere dosis, gefaciliteerde gerichte aflevering en dus lager risico op bijwerkingen, direct contact met doelwitcellen relevant voor de pathologie etc.). In deze context hebben de longen bijzondere eigenschappen als doelwitorgaan voor lokale toediening van geneesmiddelen, inclusief siRNA therapeutica. Eén van deze specifieke eigenschappen is het gebruik van pulmonale oppervlakte-actieve stoffen (pulmonaal surfactant, PS) bij de toediening van geneesmiddelen, een aanpak die de laatste jaren steeds meer aan aandacht wint. In **Hoofdstuk 2** werd een

literatuurstudie uitgevoerd naar de toepassing van PS en specifieke oppervlakte-actieve eiwitten (surfactant proteins, SP's) als biomaterialen voor (pulmonale) geneesmiddelaafgifte. Recent rapporteerden verschillende onderzoeksgroepen over het feitelijke voordeel van het gebruik van biomaterialen als in vivo transportmiddelen voor therapeutica, met de bedoeling een verhoogde biocompatibiliteit te combineren met potentiële endogene targeting. In dit opzicht is PS een bijzonder biomateriaal waarvan is bewezen dat het zowel de verspreiding van geneesmiddelen in het longweefsel als de intracellulaire afgifte van NPs en hun cargo kan bevorderen. Bovendien haalden we in dit hoofdstuk het unieke profiel aan van SP's en hun impact op de verschillende stappen van het geneesmiddel afgifteproces, waaronder modulatie van de pulmonale distributie, cellulaire targeting en intracellulaire afgifte. Meer specifiek beschreven we het effect van het gespecialiseerde long surfactant proteïne B (SP-B) op de verbeterde siRNA afgifte van proteolipide-gecoate hydrogel nanopartikels (i.e. nanogels), een hybride nanocompositie ontwikkeld in onze onderzoeksgroep voor siRNA inhalatietherapie. Het omhullen van de met siRNA beladen nanogels (siNGs) met een proteolipiden samenstelling inclusief SP-B bleek niet alleen de colloïdale stabiliteit van de NPs te verbeteren, maar ook de cytosolische siRNA afgifte door dergelijke nanocomposieten in een longepitheel celmodel.

Omdat het gunstige effect van PS en het PS-geassocieerde SP-B op de intracellulaire afgifte van siRNA een vrij recente bevinding is, hebben we in **Hoofdstuk 3** getracht die factoren te onderzoeken die de door SP-B gemedieerde afgifte in doelwitcellen (positief of negatief) beïnvloeden. In eerste instantie toonden we een identiek gunstig effect aan van PS op siRNA afgifte in extra-pulmonale celtypen, hetgeen suggereert dat de voordelige rol van SP-B niet beperkt is tot longcellen en dat de toepassing ervan mogelijk zou kunnen geëxtrapoleerd worden naar andere doelwitorganen en andere toedieningsmodaliteiten. Bovendien onderzochten we de invloed van de diverse componenten van de hybride nanoformulatie op de functie van SP-B in meer detail, wat een cruciale rol van de omringende lipidenmembranen onthulde. Aangezien in de alveolaire ruimte de functie van SP-B in long surfactant sterk afhankelijk is van diens combinatie met de PS-specifieke lipiden, bevestigen deze gegevens een mogelijke analogie tussen het SP-B werkingsmechanisme op de alveolaire interface en het intracellulaire niveau.

Het SP-B werkingsmechanisme dat verantwoordelijk is voor het reduceren van de oppervlaktetension aan de alveolaire interface is uitgebreid beschreven. Het positieve effect op de intracellulaire siRNA afgifte van proteolipide-gecoate nanogels werd door onze groep eerder gerapporteerd, maar de mechanistische inzichten bleven tot op heden onopgehelderd. In **Hoofdstuk 4** beoogden we daarom een dieper inzicht te krijgen in de (intra-)cellulaire interacties tussen SP-B en cellulaire membranen, verantwoordelijk voor de geobserveerde verbeterde siRNA afgifte. Via geavanceerde microscopische technieken, inclusief spinning disc confocale microscopie en focused ion-beam scanning elektronenmicroscopie (FIB-SEM), slaagden we erin om (1) de cytosolische afgifte van siRNA te visualiseren en (2) de impact aan te tonen van SP-B op de intracellulaire distributie van lipide nanomaterialen. Deze experimenten bevestigden eerdere gegevens die erop wezen dat SP-B geen (gunstig) effect heeft op de intracellulaire opname van de siRNA beladen nanocomposieten, maar dat het eiwit eerder actief is op het endolysosomaal niveau. Gedetailleerde membraanfusie assays toonden een sterke correlatie tussen de pH-onafhankelijke SP-B gemedieerde fusie met anionische endosomale membranen en cytosolische siRNA afgifte, een werkingsmechanisme vergelijkbaar aan bepaalde lipide-omhulde virussen en zogeheten cell-penetrating peptides (CPPs). Voortbouwend op deze nieuw verkregen inzichten konden we de SP-B proteolipiden

samenstelling verder optimaliseren, hetgeen leidde tot een substantiële verbetering van de intracellulaire siRNA afgifte.

Het gebruik van SP-B als adjuvans voor siRNA afgifte vertegenwoordigt een unieke benadering bij het herpositioneren van een endogeen materiaal (i.e. long surfactant) voor geneesmiddel afgifte. Echter, de brede toepassing van SP-B als intrinsieke component van nanomedicijnen omvat bijkomende uitdagingen. De exacte 3D-structuur van SP-B is niet experimenteel gedefinieerd en zowel het SP-B verkregen via chemische synthese of recombinante aanmaak lijkt de membraan-specifieke interacties van het oorspronkelijke natuurlijke eiwit niet te kunnen nabootsen. Daarom is de enige huidige methode om SP-B te verkrijgen via extractie en opzuivering uit PS van dierlijke oorsprong, hetgeen echter een beperkende factor is in het klinisch gebruik van SP-B gebaseerde nanocarriers. In **Hoofdstuk 5** werden om deze reden diverse SP-B afgeleide peptiden getest, die wel via chemische synthese kunnen worden aangemaakt. Meer specifiek focuste dit hoofdstuk op het in de literatuur beschreven Mini-B (MB) en Super Mini B (SMB) peptide, die enkel van elkaar verschillen door de aanwezigheid van het hydrofobe N-terminale heptapeptide segment. Opmerkelijk is dat alleen het SMB peptide, waarin deze specifieke sequentie aanwezig is, het gunstige effect van SP-B op de siRNA afgifte kon nabootsen, zowel in proteolipide-gecoate nanogels als in eenvoudiger lipide-nanopartikel (LNP) complexen. Bovendien resulteerden eerdere experimenten met een synthetisch peptide (i.e. KL4) dat de C-terminus van het SP-B eiwit nabootst, niet in een positief effect op de genonderdrukking, wat het belang van het N-terminale deel in endosomale ontsnappingsprocessen en cytosolische siRNA afgifte verder bevestigt. De ontdekking van de endosomale ontsnappingsactiviteit van het synthetische SMB peptide biedt interessante opportuniteiten voor de toekomstige ontwikkeling van PS-geïnspireerde en siRNA-beladen nanocarriers.

Tot slot geven we in **Hoofdstuk 6** een kritische blik op de bredere internationale context van dit doctoraatswerk en bespreken we het toekomstperspectief van dit onderzoeksdomein in meer detail. In dit hoofdstuk werd eerst een update gegeven over de huidige medische stand van zaken van siRNA therapie en worden de meest belangrijke verwezenlijkingen besproken sinds de ontdekking van het RNAi mechanisme die resulteerden in de recente klinische opmars van siRNA-gebaseerde geneesmiddelen. Hoewel de long een uiterst interessant doelwit is voor RNAi inhalatietherapie, suggereert het gebrek aan therapieën in de diverse fasen van klinische onderzoek de verdere noodzaak voor de ontwikkeling van meer geavanceerde toedieningsmodaliteiten. In deze context stellen we voor dat het verkrijgen van een dieper inzicht in de interacties tussen medische nanomaterialen ter hoogte van de nano-bio-interface, die specifiek is voor het longweefsel, een belangrijke drijvende kracht kan zijn voor de ontwikkeling van toekomstige RNA toepassingen in de kliniek.