

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/55847> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Noteborn, Willem

Title: Supramolecular polymer materials for biomedical applications and diagnostics

Date: 2017-12-11

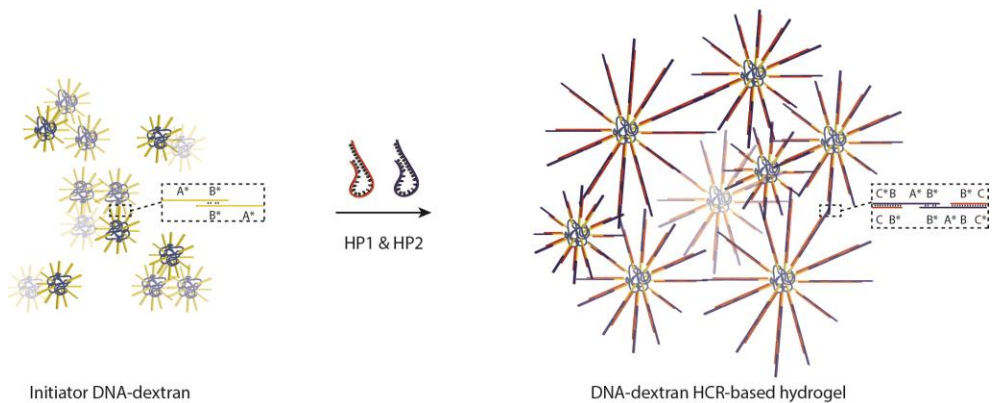
CHAPTER 7

Nederlandse Samenvatting en Perspectieven

Zelf-assemblage is een zeer veel voorkomend proces in de natuur dat vitaal is voor vele processen in levende organismen. De laatste decenia hebben de wetenschapsvelden van de supramoleculaire- en polymeerchemie een geïntegreerde inspanning gedaan om supramoleculaire polymeren te ontwerpen, synthetiseren en toe te passen. Supramoleculaire polymeren maken gebruik van relatief zwakke niet-covalente interacties zoals waterstofbrug formatie, hydrofobe/hydrofiele scheiding en π -interacties om de zelf-assemblage van een breed scala aan zowel natuurlijke als artificieel ontwikkelde moleculaire bouwstenen te programmeren. Door toepassing van deze principes zijn eind-gefunctionaliseerde polymeren gemaakt die interacteren via moleculaire herkenning en gestapelde monomeren die zelf-assembleren in één-dimensionale structuren. Deze supramoleculaire polymeren hebben de mogelijkheid om bij hoge concentratie hydrogel materialen te maken door fysische of covalente interacties tussen de overlappende polymeren en daardoor de stroom van oplosmiddelen te minimaliseren. De mogelijkheid van deze materialen om te zelf-assembleren in water en te reageren op externe stimuli zoals warmte, licht, pH, ion sterkte en katalyse het mogelijk gemaakt om functionele supramoleculaire materialen te creëren met applicaties variërend van sensoren tot medicijn afgifte platformen en biomaterialen. Een uniek en natuurlijk voorkomend supramoleculair polymeer is DNA, dat los van zijn rol in genetica ook gebruikt kan worden als een bouwsteen voor zowel structurele als dynamische toepassingen zoals het maken van goed georganiseerde drie-dimensionale roosters of reconfigureerbare en autonoom werkende op DNA gebaseerde apparaten. Een bijzondere en noemenswaardige reactie is de hybridisatie ketting reactie, een DNA overhang gedreven streng verdringingsreactie die veel potentie heeft in de detectie en amplificatie van nucleïnezuur gebaseerde signalen. Elke klasse van materialen heeft zijn eigen voordelen heeft en daarom is het ontwerpen van uit meerdere componenten bestaande materialen een mogelijkheid om zeer geavanceerde, georganiseerde en responsieve materialen te maken. Door gebruik te maken meerdere type bouwstenen zoals DNA, supramoleculaire- en covalente polymeren kunnen materialen gecreërd worden vanuit zowel het oogpunt van hun structuur en functie. Deze dissertatie is toegespitst op het ontwerp van dergelijke uit meerdere componenten bestaande functionele supramoleculaire materialen voor toepassingen in de biomedische wereld en diagnostiek.

In hoofdstuk 2 is de synthese van een dextraan copolymeer met DNA zijtakken beschreven. Ik heb een nieuwe strategie ontwikkeld om DNA zijtakken te vormen op de dextraan polymeren door gebruik te maken van de hybridisatie ketting reactie (HCR) als drijvingskracht voor zijtak groei vanaf het copolymeer (Figuur 7.1). Het ontwerp omvat de immobilisatie van gethioleerde HCR initiator sequenties via

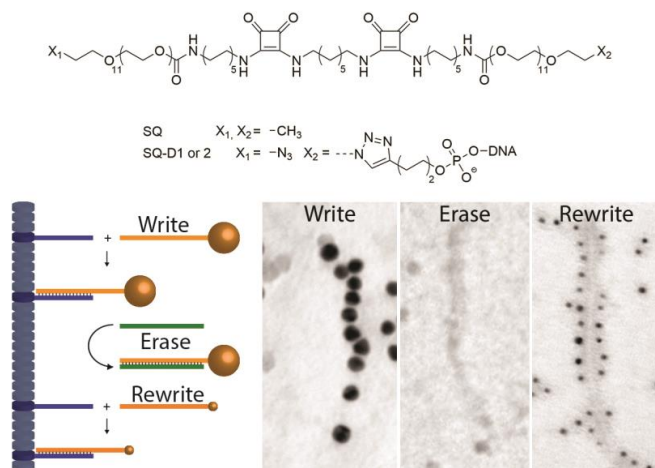
een Michael additie met een met vinyl sulfon gefunctionaliseerde dextraan. Het initiator-DNA polymeer is net zoals het ongeconjugeerde initiator DNA in staat om de groei van de zijtakken te starten wanneer het samengevoegd wordt met twee complementaire HCR hairpin DNAs. Opvallend is dat homodimeer interacties tussen de initiator sequenties resulteert in de formatie van geaggregeerde initiator DNA-dextraan clusters voordat de groei van de zijtakken door HCR start. Deze aggregaten hebben nog steeds de mogelijkheid om de HCR te initialiseren en vormen de gegroeide zijtakken op de copolymeren vormen nog grotere geaggregeerde clusters door vergelijkbare homodimeer interacties. Na verhitting van de aggregaten tot 60 °C worden de monomeren terug verkregen. Met behulp van gel electroforese, fluorescentie, licht verstrooiing (DLS, SAXS) en atoomkrachtmicroscopie werden de morfologische veranderingen van deze polymeren te bestudeerd. Bij hogere concentraties kan de uitvoering van de hybridisatie ketting reactie op de copolymeren resulteren in de formatie van hydrogel materialen, zoals gedemonstreerd is met behulp van microreologie. Door kleine aanpassingen in dit systeem en de toevoeging van een katalytische amplificatie strategie kan er een detectie systeem voor specifieke oligonucleotide-gebaseerde doelwit moleculen, zoals microRNAs, gerealiseerd worden. Hierdoor zou deze aanpak in de toekomst een simpele en robuuste methode kunnen opleveren om biomarkers van specifieke ziektes te detecteren zonder gebruik te maken van gespecialiseerde apparatuur.



Figuur 7.1. Groei van DNA zijtakken vanaf een hybride DNA-dextraan copolymeer door gebruik te maken van de hybridisatie ketting reactie

Hoofdstuk 3 beschrijft het ontwerp en de synthese van een op squaramides gebaseerd functioneel supramoleculair polymeer. Dit supramoleculaire polymeer kan gebruikt worden voor het reversibel binden van goud deeltjes (Figuur 7.2). De synthese van DNA-gefunctionaliseerde supramoleculaire monomeren is beschreven waarbij koper gekatalyseerde azide-alkyn ringaddities tussen hexynyl-

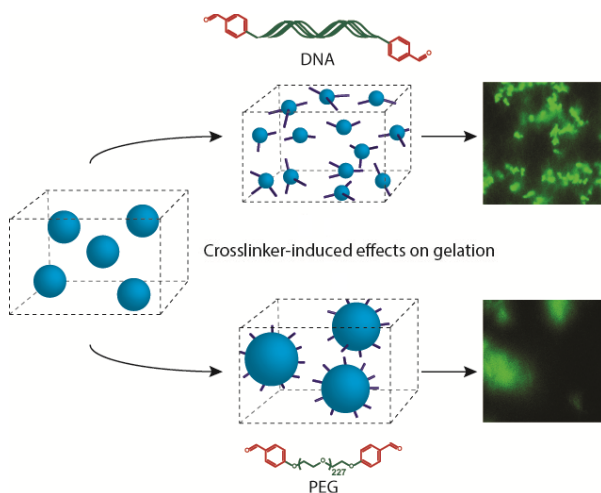
gefunctionaliseerd DNA en azide gefunctionaliseerde bolaamfifiele supramoleculaire monomeren gebruikt werden om de doelmoleculen te synthetiseren. Vervolgens werd de incorporatie van de DNA-gefunctionaliseerde monomeren in niet-gefunctionaliseerde supramoleculaire polymeren gedemonstreerd door gebruik te maken van zeta potentiaal metingen. Als laatste is het tegelijkzijdige laden en lossen van verschillende groottes DNA-gefunctionaliseerde goud nanodeeltjes (5 en 15 nm) gedemonstreerd. Hiervoor werd gebruik gemaakt van DNA streng verdringingsreacties, waarin selectief sequentie specifieke doelwitten geadresseerd werden, resulterend in het selectief verwijderen van goud nanodeeltjes. De vorming van deze reversibel adresseerbare gefunctionaliseerde fibers en de streng verdringingsreacties werd gekarakteriseerd behulp van transmissie electron microscopie studies in combinatie met gel electroforese en fluorescentie experimenten. Met dit nieuwe supramoleculaire platform is het dan mogelijk om op een gecontroleerde manier lading (goud nanodeeltjes) te schrijven, wissen en herschrijven. Hierdoor kan dit systeem mogelijk gebruikt worden om supramoleculaire fibers te maken waarop specifieke cellulaire signaal moleculen geladen kunnen worden. Deze zouden gebruikt kunnen worden voor bijvoorbeeld differentiatie van cellen aan te sturen. Op deze manier zouden meerdere en verschillende signaal moleculen op een opeenvolgende manier gepresenteerd en verwijderd kunnen worden, hetgeen specifieke controle over cellulaire signalering op kan leveren. Als het systeem responsief gemaakt wordt voor bijvoorbeeld de aanwezigheid en detectie van specifieke miRNA sequenties dan zou een andere



Figuur 7.2. Reversibel laden van nanogrootte elementen op een uit meerdere componenten bestaand supramoleculair polymeer door middel van DNA streng verdringingsreacties

mogelijk toepassing van dit systeem het specifiek afgeven van medicinale lading kunnen zijn.

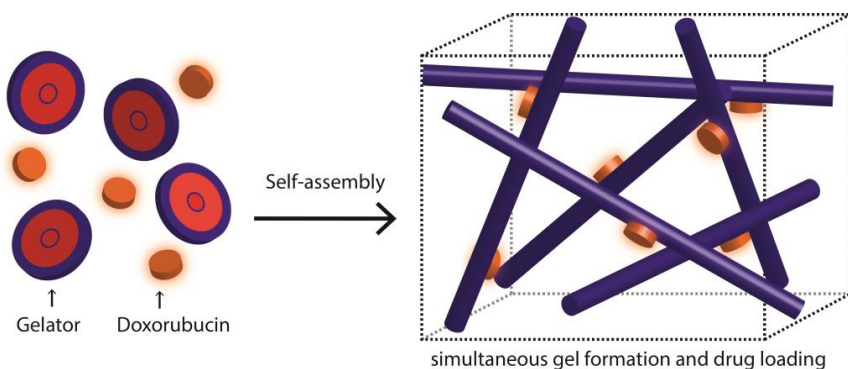
Hoofdstuk 4 laat het effect van crosslinkers zien op de vorming van een reactie gekoppelde laag moleculair gewicht hydrogelator (LMWG) systeem dat uit meerdere componenten bestaat. Het doel hiervan is de mechanische eigenschappen van het resulterende netwerk te verbeteren. In dit LMWG systeem wordt een hydrazon verbinding gemaakt tussen een hydrofobe cyclohexaan trishydrazide binnenkant en drie hydrofiele di(ethyleen glycol) benzaldehyde moleculen om zo de formatie van een hydrogel te bewerkstelligen. Twee verschillende crosslinkers werden gesynthetiseerd om ze vervolgens in het uit fibers bestaande hydrogel netwerk te incorporeren: een stijf en geladen DNA- en een zachte neutrale polyethyleen glycol (PEG) gemodificeerde crosslinker, beide met eind-gefunctionaliseerde benzaldehyde motieven (Figuur 7.3). Reologische metingen toonden aan dat de toevoeging van tot 1.0 mol% DNA crosslinker resulteerde in een tot maximaal 4.5 voudig verbeterde mechanische sterkte, terwijl de PEG crosslinker bij geen enkele concentratie een positief effect had op de sterkte van de hydrogel. Met behulp van fluorescente confocale laser scanning microscopie wordt het mechanisme van nucleatie en groei bestudeert. Hierdoor konden de positieve en negatieve effecten van de verschillende crosslinkers (DNA, PEG) op de netwerk formatie en de mechanische eigenschappen verklaard worden.



Figuur 7.3. Crosslinker-geïnduceerde effecten op het gelatie proces van een laag moleculair gewicht hydrogelator systeem

Deze studie liet dus niet alleen het effect van de crosslinkers met verschillende stijfheid op de mechanische eigenschappen van het netwerk zien, maar ook het effect dat additieven kunnen hebben op de vorming van hydrogelen. Aangezien de incorporatie van crosslinkers en andere (bio)moleculen noodzakelijk is om functionele materialen te maken voor biologische applicaties, heeft dit werk laten zien dat het mogelijke effect van de incorporatie van functionaliteit in ogenschouw genomen moet worden het ontwerp. Tenslotte toont dit werk de mogelijkheid om extra controle over de zelf-assemblage van reactie gekoppelde LMWG-systemen te krijgen, wat van belang is om toepassingen te ontwikkelen voor deze laag molecuul gewicht gelators.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van een medicijn afgifte platform door gebruik te maken van hetzelfde LMWG systeem zoals beschreven in hoofdstuk 4 (Figuur 7.4). Als eerste zijn er hydrogels bij pH 7.0 gemaakt door gebruik te maken van een nucleofiele en biocompatibele katalysator, L-histidine methyl ester. Deze hydrogels zijn vervolgens met behulp van reologie en rasterelectronenmicroscopie bestudeerd. Vervolgens is het anti-kanker medicijn Doxorubicine geïncorporeerd door gebruik te maken van de reactieve keton groep in de acetyl zijketen van het molecuul. Uit deze experimenten bleek dat de mate van Doxorubicine conjugatie beïnvloed kan worden op een tijdafhankelijke manier door de incubatietijd van het keton bevattende medicijn met de hydrazine bevattende gelator kern te veranderen. Door de incubatietijd van Doxorubicine en de gelator kern te variëren vóór de toevoeging van de aldehyde gelator werd niet alleen de mate van medicijn conjugatie bepaald maar werden ook de mechanische eigenschappen van het netwerk en de



Figuur 7.4. Gecontroleerde medicijn afgifte door reactie tijd veranderingen in een reactie gekoppeld laag moleculair gewicht hydrogel systeem.

medicijn afgifte profielen significant beïnvloed. Tenslotte kon de Doxorubicine-hydrogel het medicijn op een effectieve manier *in vitro* aan MCF-7 borstkanker cellen afgeven. Hiermee werd bewezen dat dit afstembare uit meerdere componenten bestaande hydrogel systeem effectief gebruikt kan worden als medicijn afgifte platform. De mogelijkheid om reactietijd te koppelen aan de hoeveelheid conjugatie en het effect ervan op de zowel de afgifte- als de mechanische eigenschappen van hydrogel materialen kan gebruikt worden voor verdere ontwikkeling van de gebruiker gedefinieerde controle over supramoleculaire materialen voor toepassingen in het biomedische domein.

