ETH zürich

ETH Library

Production of extracellular vesicles and investigation of their use as nucleic acid carriers

Doctoral Thesis

Author(s):
Bader, Johannes Josua

Publication date:
2024

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-b-000671874

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

DISS. ETH NO. 29995

Production of extracellular vesicles and investigation of their use as nucleic acid carriers

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Johannes Josua Bader

M.Sc. in Pharmaceutical Sciences,
Ludwig-Maximilians-Universität München
born on 24.12.1994

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux
Prof. Dr. Angela Steinauer

2024

SUMMARY

Cell-derived extracellular vesicles (EVs) are gaining prominence as biogenic drug delivery systems (DDS) because of their pivotal role in cellular communication and transport of biological molecules. EVs are a heterogeneous mixture of vesicles that are released into the extracellular space and originate from endosomal compartments or *via* plasma membrane budding. Based on the two biogenesis pathways and the physicochemical properties of EVs, they can be classified into exosomes, which are smaller than 200 nm, and ectosomes, with sizes ranging from 50 nm to several micrometers in diameter. The complex composition of EVs is contingent on the biogenesis pathway, the cell type and its physiological state. The lipid bilayer harbors a diverse array of membrane proteins, while the aqueous lumen of these vesicles incorporates soluble proteins and nucleic acids (NAs) like mRNA and miRNA. However, the natural NA incorporation into EVs is limited, resulting in only a few sequences per hundreds or thousands of vesicles. Researchers have pursued strategies to enhance NA cargo loading, involving engineering producer cells to augment the incorporation of cell-expressible NAs or post-isolation loading by destabilizing the EV membrane using physical forces or chemical reagents. Despite these efforts, both strategies currently face challenges in efficiently encapsulating therapeutic amounts of NAs into EVs without compromising their integrity and intrinsic biological activity. Additionally, the translation of EV-based DDS is hampered by inefficient EV production processes from mammalian cell cultures and the non-specific isolation techniques that co-purify cellular impurities such as protein aggregates. This thesis aims to address these challenges by providing tools to 1) efficiently encapsulate NAs into EVs while preserving their complex composition and biological functionality and 2) to enhance and expedite the production of EVs derived from mesenchymal stem cells (MSCs), a clinically relevant source of therapeutic EVs.

In this respect**, Chapter 1** compares EVs and lipid nanoparticles (LNPs) as nucleic acid carriers, focusing on their fundamental characteristics, including their physicochemical properties and composition. The chapter also provides an in-depth review on the various techniques to load NAs into these nanocarriers. **Chapter 2** outlines the existing challenges in achieving scalable EV production processes and introduces machine learning and modeling-based approaches in EV research and development. In **Chapter 3** non-lamellar lipid liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) are presented as a versatile platform for loading various NAs (*i.e.*, siRNA, mRNA and RNA aptamers) into small EVs (< 200 nm). Our findings reveal that non-lamellar sponge phases

can trigger a controlled fusion processes between LCNPs and EVs, resulting in the formation of hybrid semi-synthetic EVs (HEVs). Interestingly, at acidic conditions the LCNPs exhibited inverted hexagonal phases, which led to aggregation with EVs. Advanced nanocharacterization tools demonstrated that EV membrane proteins and NAs were successfully transferred onto/into HEVs, with around 40% of the HEV population effectively loaded with the NA cargo. Notably, the intrinsic biological activity of MSC-derived EVs was preserved, and the *in vitro* transfection potency of these non-lamellar LNPs was enhanced post-hybridization with EVs. **Chapter 4** describes a 3D cell culture process for the scalable production of MSC-EVs on microcarrier matrices. The production process parameters (*i.e.*, microcarrier concentration, seeding density, impeller speed and centrifugation time) were altered with the goal to maximize the yield and bioactivity of MSC-EVs while minimizing the amount of cellular impurities. A multi-objective batch Bayesian optimization (MOBBO) algorithm was applied to find trade-offs for developing an optimal EV production process. **Chapter 5** concludes by discussing the key findings of this thesis and proposes future experiments focusing on mechanistic studies of the LCNP-EV fusion process and investigations on the *in vivo* fate of HEV particles.

ZUSAMMENFASSUNG

Zell-abgeleitete extrazelluläre Vesikel (EV) gewinnen aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der zellulären Kommunikation und dem Transport biologischer Moleküle zunehmend an Bedeutung als biogene Arzneistoffträgersysteme. EVs sind eine heterogene Mischung von Vesikeln, die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und ihren Ursprung in endosomalen Kompartimenten oder durch Knospung an der Plasmamembran haben. Aufgrund dieser beiden Biogenesewege und den physikochemischen Eigenschaften der EV können sie in Exosomen klassifiziert werden, die kleiner als 200 nm sind, und Ektosomen, die Durchmesser von 50 nm bis zu mehreren Mikrometern aufweisen. Die komplexe Zusammensetzung der EV hängt vom Biogeneseweg, dem Zelltyp und dem physiologischen Zustand der Zelle ab. Auf der Lipidmembran befindet sich eine Vielzahl von Membranproteinen, während sich im wässrige Lumen dieser Vesikel lösliche Proteine und Ribonukleinsäuren (RNS) wie mRNA und miRNA befinden. Die natürliche Inkorporation von RNS in EV ist jedoch niedrig, was zur Beladung von nur wenigen Sequenzen pro Hunderte oder Tausende von Vesikeln führt. Forscher verfolgen Strategien, um die Beladung mit RNS zu verbessern, darunter ist die Modifikation von EV-Produzentenzellen zur Steigerung der Inkorporation von zellexprimierbarer RNS oder die Beladung nach der EV-Aufreinigung durch Destabilisierung der EV-Membran mittels physikalischer Kräfte oder chemischer Reagenzien. Trotz dieser Bemühungen stehen beide Strategien derzeit vor der Herausforderung, therapeutische Mengen RNS effizient in EV zu inkorporieren, ohne deren Integrität und intrinsische biologische Aktivität zu beeinträchtigen. Darüber hinaus wird die Entwicklung von EV-basierten Arzneistoffträgersysteme durch ineffiziente EV-Produktionsprozesse aus Säugetierzellkulturen verlangsamt. Zudem beeinträchtigen unspezifische Aufreinigungstechniken, welche zelluläre Verunreinigungen wie zum Bespiel Proteinaggregate mitisolieren, den Produktionsprozess. Die vorliegende Dissertation setzt sich zum Ziel diese Herausfoderungen zu adressieren und beschreibt neuartige Methoden, um 1) RNS effizient in EV zu inkorporieren und dabei ihre komplexe Zusammensetzung und biologische Funktionalität zu bewahren, und 2) die EV-Produktion von mesenchymalen Stammzellen zu verbessern und zu beschleunigen, welche eine hohe klinische Relevanz aufweisen.

In diesem Kontext vergleicht **Kapitel 1** EV und Lipidnanopartikeln (LNP) als Arzneistoffträgersysteme für RNS und beschreibt deren fundamentalen Charakteristika,

einschließlich ihrer physikochemischen Eigenschaften und Zusammensetzung. Des Weiteren werden verschiedene Techniken zur Beladung dieser Nanoträgersysteme mit RNS diskutiert. **Kapitel 2** skizziert die bestehenden Herausforderungen bei der Umsetzung einer skalierbaren EV-Produktion und führt in die Benutzung des maschinellen Lernens und computergestützen Modellierungsansätzen in der EV-Forschung und Entwicklung ein. In **Kapitel 3** werden nicht-lamellare lipide flüssigkristalline Nanopartikel (LCNP) zur Beladung verschiedener RNS (z.B. siRNA, mRNA und RNA Aptamere) in „kleine EV" (< 200 nm) vorgestellt. Unsere Ergebnisse zeigen auf, dass nicht-lamellare schwammähnliche Phasen Fusionsprozesse zwischen LCNP und EV auslösen konnten, wodurch sich hybride halbsynthetische EV (HEV) ausbildeten. Interessanterweise zeigten die LCNP unter sauren Bedingungen invertierte hexagonale Phasen auf, was zu einer Aggregation mit EV führte. Moderne Nanocharakterisierungswerkzeuge zeigten, dass EV-Membranproteine und die RNS auf oder respektive in die HEV-Trägersysteme übertragen wurde, wobei etwa 40% der HEV-Population effektiv mit RNS beladen wurde. Bemerkenswerterweise wurde die intrinsische biologische Aktivität der Stammzell-EV dabei bewahrt. Zudem steigerte sich Transfektionspotenz der nicht-lamellaren LCNP-Trägersysteme nachdem sie mit EV hybridisiert wurden. **Kapitel 4** beschreibt einen 3D-Zellkulturprozess für die skalierbare Produktion von Stammzell-EV auf Mikroträgern. Die Produktionsprozessparameter (z. B. Mikroträgerkonzentration, Ansaatdichte der Zellen, Rührerdrehzahl und Zentrifugationszeit) wurden verändert, um den Ertrag und die Bioaktivität von Stammzell-EV zu maximieren und gleichzeitig die Menge zellulärer Verunreinigungen zu minimieren. Ein „Multi-Objective Batch Bayesian Optimization" (MOBBO)-Algorithmus wurde angewendet, um Lösungen zu finden welche den optimalen EV-Produktionsprozess am besten beschreiben. **Kapitel 5** schliesst mit einer Diskussion der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit und schlägt zukünftige Experimente zu mechanistischen Studien des LCNP-EV-Fusionsprozesses und zu *in vivo* Untersuchungen von HEV-Partikeln vor.