



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Crossing barriers, delivery of llama antibody fragments into the brain

Rotman, M.

Citation

Rotman, M. (2017, April 19). *Crossing barriers, delivery of llama antibody fragments into the brain*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/48860>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/48860>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/48860> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Rotman, M.

Title: Crossing barriers, delivery of llama antibody fragments into the brain

Issue Date: 2017-04-19

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

De ziekte van Alzheimer (AD) is een belangrijke oorzaak van het syndroom dementie, één van de meest ernstige bedreigingen voor de volksgezondheid in zowel de ontwikkelde wereld als in ontwikkelingslanden ten gevolge van de toenemende vergrijzing. AD wordt gekenmerkt door progressieve cognitieve achteruitgang en karakteristieke pathologische afwijkingen. Deze afwijkingen zijn onder andere ophopingen van het eiwit tau en van het peptide amyloïd beta ($A\beta$). Tau hoopt zich op in de neuronen, de zenuwcellen in de hersenen. Het peptide $A\beta$ hoopt zich op in de hersenen buiten de cellen en hoopt zich ook op rondom de bloedvaten van de hersenen. Door deze ophopingen kunnen de cellen en de bloedvaten hun werk niet goed meer doen.

Er is op dit moment geen medicijn beschikbaar welke AD kan voorkomen. Eén van de problemen van het ontwikkelen van een medicijn is de bloed-hersenbarrière, een zeer strict gereguleerde barrière tussen het bloed en de hersenen. Potentiële medicijnen moeten niet alleen effectief zijn tegen de ziekte; ze moeten ook deze barrière passeren. Recente klinische proeven richten zich voornamelijk op het gebruik van antistoffen welke het $A\beta$ peptide kunnen binden. Het doel is dan de ophopingen te verminderen, door ofwel de ophoping te voorkomen, ofwel de bestaande ophopingen te verwijderen. In dit proefschrift hebben we ons gericht op het gebruik van een deel van een speciaal type antistof welke voorkomt in lama's en andere kameelachtigen. Dit speciale lama antistof is kleiner dan de normale antistoffen, en het fragment dat wij gebruiken heet VHH.

Het VHH is het deel van dit kleinere antistof dat het antigeen bindt, in ons geval bijvoorbeeld het peptide $A\beta$. VHHs hebben een aantal voordelen: ze zijn 10 keer kleiner dan conventionele antistoffen, ze zijn gemakkelijker te produceren, ze zijn stabiel qua temperatuur en qua pH gevoeligheid, en ze kunnen aangepast worden voor een breed aantal toepassingen. Een voorbeeld van zo'n toepassing is de detectie en preventie van $A\beta$ ophopingen door speciaal geselecteerde VHHs. Dit alles maakt VHHs interessante kandidaten voor verschillende therapeutische strategieën in het AD onderzoek. Het eerste doel van dit proefschrift is het bepalen van het potentieel van onze geselecteerde VHHs in de strijd tegen AD. Het tweede doel is verschillende manieren te onderzoeken om de VHHs de bloed-hersenbarrière te laten passeren, om ze zo de plaats van bestemming (oftewel de hersenen) te laten bereiken.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene inleiding tot AD en een uitleg over de selectie, productie en toepassing van VHHs. In hoofdstuk 2 worden VHHs gebruikt om invloed uit te oefenen op de productie van het $A\beta$ peptide. Hierbij is gebruik gemaakt van VHHs welke zijn geselecteerd tegen de functie van het beta-secretase eiwit BACE1. Eén VHH, VHH-B3a, verminderde de

activiteit van BACE1 met 50%. Hierdoor wordt er uiteindelijk minder A β geproduceerd. Deze rem op de activiteit van BACE1 is aangetoond in zowel een *in vitro* test als in een test op basis van gekweekte cellen. Het effect, de verminderde productie van A β , is vervolgens aangetoond in levende AD muismodellen. De resultaten van VHH-B3a zijn veelbelovend, en het therapeutisch nut van de verminderde A β productie als gevolg van VHH-B3a moet nu worden aangetoond in gedragsstudies in de muismodellen. Echter, om VHH-B3a in de hersenen te krijgen, is een ruwe methode toegepast, waarbij het VHH direct in de hersenventrikels is geïnjecteerd. Hoewel hoofdstuk 2 aantoont dat deze methode effectief is, is deze methode niet ideaal voor een langdurige therapeutische toepassing. En ondanks dat VHH-B3a zeer interessant is als BACE1 remmer, is geen enkel VHH bruikbaar als het niet in staat is de bloed-hersenbarrière efficiënt te passeren op een niet-invasieve manier. Daarom richten de hoofdstukken 3, 4, en 5 zich allen op verschillende methodes om VHHs over deze barrière te transporteren. VHH-pa2H is gekozen om de transportmethodes te testen. Dit voornamelijk omdat VHH-pa2H A β ophopingen zeer efficiënt kan binden.

In hoofdstuk 3 hebben we getest of het mogelijk is VHH-pa2H als cargo in liposomen over de bloed-hersen barrière te transporteren. We hebben twee verschillende type liposomen getest; EYPC en DMPC. Het gebruik van DPMC zorgde niet voor een hoger transport van VHH-pa2H de hersenen in. Maar het gebruik van EYPC liposomen daarentegen zorgde wel voor een hoger transport, en het VHH hoopte zich op in de hersenen van de muismodellen welke de karakteristieke A β deposities hebben waaraan VHH-pa2H kan binden. Om de opname van het VHH in de hersenen te kunnen volgen, hebben we een radioactief molecuul aan het VHH gekoppeld, maar pas nadat het in het liposoom was opgenomen. Dit stelde ons niet alleen in staat om alleen het VHH te volgen, en niet, zoals doorgaans gebruikelijk is, het liposoom; maar ook om het VHH-liposoom complex ruim van te voren klaar te maken, en slechts vlak voor gebruik te labelen met het radioactieve molecuul. Hierdoor wordt het VHH-liposoom complex interessanter voor therapeutisch gebruik in combinatie met toepassingen met radioactief VHH. Het transporteren van VHHs over de bloed-hersen barrière met behulp van liposomen lijkt een goede mogelijkheid te zijn voor VHH-pa2H en kan zonder twijfel worden toegepast voor andere VHHs.

Vervolgens hebben we onderzocht of het mogelijk is VHHs de bloed-hersen barrière te laten passeren zonder de hulp van liposomen. Een van de nadelen van het feit dat VHHs zo klein zijn, is dat ze zeer snel uit het bloed worden verwijderd na injectie. Daarom beredeneerden we dat als het VHH meer tijd heeft om in contact te blijven met de barrière, het beter in staat zou zijn de barrière door middel van een actief proces te passeren. Om het VHH meer tijd te gunnen, hebben we de staart van een normaal antistof aan het VHH gekoppeld, zoals beschreven is in hoofdstuk 4. Door de staart bleef VHH-pa2H inderdaad veel langer in het bloed. Echter, er werd

niet meer VHH met staart in de hersenen aangetroffen dan in de situatie waarbij het VHH geen staart heeft. Daarom concludeerden we dat hoewel het aanbrengen van een staart succesvol is met betrekking tot het verlengen van de mogelijkheid tot interactie, het verlengen van de tijd in het bloed alleen niet voldoende is om VHH-pa2H over de barrière te helpen.

Tot slot wordt in hoofdstuk 5 beschreven hoe we de genetische informatie van VHH-pa2H in een klein virusdeeltje hebben geplaatst. Het specifieke virus dat hiervoor gebruikt is, wordt AAV genoemd. We hebben dit virus in de hersenen van de muismodellen geïnjecteerd. Hierdoor zijn de muizen in staat zelf continu het VHH aan te maken, direct in de hersenen. Dit is een vorm van gentherapie. Door een speciale signaalsequentie wordt VHH-pa2H nadat het aangemaakt is in de hersencellen, uit de cellen getransporteerd. Hierdoor kan het VHH de A β ophopingen binden, welke zich in de hersenen, maar buiten de cellen, bevinden. Daarnaast hebben we een bijzonder fluorescerend eiwit aan het VHH vastgemaakt, waardoor we het VHH continu kunnen volgen via een speciale microscoop techniek waarbij we in de hersenen van de levende muizen kunnen kijken. Bij muizen waarbij het virus direct na geboorte wordt toegediend, voordat er ophopingen zijn, lijken er door de aanwezigheid van VHH-pa2H uiteindelijk minder ophopingen te zijn dan in de muizen die geen virusdeeltjes hebben gekregen. Echter deze vermindering van hoeveelheid ophopingen wordt niet gezien als het virus aan oudere dieren wordt gegeven. Helaas is de hoeveelheid jonge muizen waarin dit effect is gezien aan de lage kant. Uitgebreidere studies zijn nodig om een definitieve conclusie te kunnen trekken. In oudere dieren kan het VHH duidelijk gevolgd worden via de speciale microscoop. Alleen VHH-pa2H, en niet de controle VHHs, kan de amyloïde ophopingen binden. Uiteindelijk kan worden geconcludeerd dat de virale toediening van VHHs, met behulp van de AAV virussen, een excellente en efficiënte methode is om de antilichaam fragmenten in de hersenen te krijgen. In de toekomst moet worden gewerkt aan het optimaliseren van de efficiëntie van de virale hersentoediening, door bijvoorbeeld net andere types AAV te gebruiken, of na te gaan op welke leeftijd van de dieren de efficiëntie het hoogst is. Ook zou het onderzoek zich moeten richten op de positieve gevolgen op de lange termijn van deze vorm van gentherapie, met gebruik van VHHs zoals de anti-A β VHH-pa2H of de anti-BACE1 VHH-B3a, in de hersenen van muismodellen van AD. Dit soort VHHs zijn zeer veelbelovend in de strijd tegen neurodegeneratieve ziektes, waaronder AD, en de AAV gentherapie lijkt een uitgelezen mogelijkheid te bieden om de in deze strijd cruciale aanwezigheid te verzekeren van de VHHs aan de hersenkant van de bloed-hersen barrière.

