

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18932> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Vrij, Jeroen de

Title: Improvement of oncolytic adenovirus vectors through genetic capsid modifications

Issue Date: 2012-05-10

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

Genetisch gemodificeerde virale vectoren hebben potentie voor gebruik als oncolytisch therapeuticum. In het scala aan virussen dat geëvalueerd wordt, neemt humaan adenovirus serotype 5 (HAdV-5) een voorname plaats in binnen het onderzoek naar oncolytische virustherapie. Uit klinische studies is gebleken dat kankergentherapie met HAdV-5 vectoren veilig is, maar de effectiviteit blijkt voornamelijk beperkt te zijn. Verscheidene factoren belemmeren de effectiviteit, zoals samengevat in **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift. Een voornaam probleem wordt gevormd door het onvermogen van het virus om tot de gehele tumormassa door te dringen. Dit wordt onder meer veroorzaakt door de lage en heterogene expressie van de coxsackie- en adenovirus receptor (CAR) op het oppervlak van de tumorcellen. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling en preklinische evaluatie beschreven van nieuwe oncolytische HAdV-5 vectoren. Deze vectoren zijn gericht tegen tumorcellen door middel van het koppelen van virale manteleiwitten (IX en fiber) aan verschillende typen polypeptiden.

In de hoofdstukken 3 tot en met 5 wordt de ontwikkeling en evaluatie beschreven van een nieuw HAdV-5 'tumor-targeting' systeem, gebaseerd op het fuseren van polypeptiden aan het kleinste HAdV-5 manteleiwit, eiwit IX. In **Hoofdstuk 3** wordt de haalbaarheid aangetoond van het fuseren van eiwit IX met hyperstabiele enkelstrengs antilichamen (scFv's). In tegenstelling tot normale antilichamen nemen hyperstabiele scFv's een functionele vouwing aan in het reducerende milieu van het cytoplasma, waardoor ze in potentie zeer geschikt zijn om in te bouwen in de mantel van adenovirussen. We beschrijven de fusie van eiwit IX met een hyperstabiël scFv gericht tegen β -galactosidase (13R4), waarbij een 75-Ångstrom α -helix is geïncorporeerd om de presentatie van 13R4 op het virusoppervlak te optimaliseren. Het 13R4 polypeptide bleek efficiënt te worden geïncorporeerd in de mantel van HAdV-5, en bleek de juiste vouwing aan te nemen gezien de binding aan β -galactosidase.

In het volgende hoofdstuk (**Hoofdstuk 4**) wordt aangetoond dat eiwit IX tevens geschikt is voor het beladen van HAdV-5 met enkelstrengs T cel receptoren (scTCRs). Infectie van tumorcellen kon worden verbeterd door middel van het koppelen van eiwit IX aan een scTCR (scTCR^{HLA-A1/MAGE-A1}) die gericht is tegen het kanker-testis antigeen MAGE-A1, welke gepresenteerd wordt op het celoppervlak door humaan leukocyt antigeen met haplotype A1 (HLA-A1). Ten opzichte van een controle virus bleken virusdeeltjes geladen met scTCR^{HLA-A1/MAGE-A1} in staat om HLA-A1/MAGE-A1-positieve melanoma cellen te transduceren met een tienmaal hogere efficiëntie. Tevens werd specificiteit van de HLA-A1/MAGE-A1 binding aangetoond. Deze resultaten laten zien dat eiwit IX potentieel heeft voor het richten van HAdV-5 vectoren naar kanker-testis antigeen op tumorcellen. Het principe van kanker-testis antigeen targeting, gericht tegen tumor-specifieke peptides die afkomstig zijn uit het cytoplasma van een cel, wijkt af van de conventionele targeting van oncolytische (adeno)virale vectoren, welke gericht is tegen celoppervlakte-eiwitten die tot overexpressie komen op tumorcellen. Kanker-testis antigeen zijn mogelijk zeer geschikt om als target te dienen voor kankertherapieën, doordat deze moleculen tot expressie komen op het celoppervlak van tumorcellen, maar niet op cellen in gezonde weefsels (met uitzondering van de teelballen).

In **Hoofdstuk 5** wordt uiteengezet hoe eiwit IX gebruikt kan worden voor de koppeling van Affibody eiwitten. Door het relatief kleine formaat en de hoge bindingsaffiniteit aan receptoren worden Affibody eiwitten beschouwd als interessante structuren voor tumortargeting van virussen. Eerdere publicaties duiden echter op een inefficiënte targeting na het fuseren van eiwit IX met 'hoog-affiniteit liganden', zoals Affibody eiwitten, doordat het virus niet kan loskoppelen van de receptor in het endosoom. Onze studies laten zien dat de infectie van tumorcellen verbeterd kan worden door het incorporeren van een cathepsin-knipsequentie (CKS) tussen eiwit IX en het Affibody eiwit 'ZH', welke gericht is tegen de Humane Epidermale groeifactor Receptor 2 (HER2). Het includeren van de CKS bleek noodzakelijk te zijn om tumortargeting te bewerkstelligen van eiwit IX-ZH beladen virusdeeltjes. Verbeterde infectie vond plaats van HER2-positieve targetcellen (SKOV-3 eierstokkankercellen) in verschillende modellen, zijnde monolaagkweken, 3-dimensionale sferoïdekweken en tumorkweken op de chorioallantoïsche membraan van bevruchte kippeneieren. Deze vindingen vergroten het potentieel van eiwit IX voor het koppelen van anti-tumor liganden.

In **Hoofdstuk 6** wordt een alternatieve targetingstrategie beschreven, door middel van het fuseren van een scTCR (scTCR^{HLA-A1/MAGE-A1}) met het fiber manteleiwit. In het genoom van een wildtype HAdV-5 is de sequentie coderende voor het globulaire deel van de fiber vervangen door sequenties coderende voor de scTCR^{HLA-A1/MAGE-A1} en voor een kunstmatig trimerizatie domein. Door de afwezigheid van het globulaire fiberfragment bleek het gemodificeerde virus niet meer in staat tot binding aan de Coxsackie- en Adenovirus Receptor (CAR). In plaats hiervan vond binding plaats aan HLA-A1/MAGE-A1. Als gevolg werd een sterkere en meer specifieke doding van verschillende melanoma targetcellen waargenomen.

Tot slot wordt in **Hoofdstuk 7** een studie beschreven naar de functionele gevolgen van eiwit IX deletie in het genoom van HAdV-5 vectoren. Verschillende effecten vinden plaats, waaronder een verhoogde afgifte van transgenen in CAR-negatieve cellen en een verhoogde activatie van bepaalde typen cellen van het aangeboren immuunsysteem. De bevindingen suggereren dat eiwit IX een rol speelt in de totstandkoming van het cellulair tropisme, en dat het eiwit een functie heeft bij vermindering van de aangeboren immunrespons. Deze aspecten verdienen nader onderzoek bij verdere ontwikkeling van oncolytische HAdV-5 vectoren met eiwit IX modificaties.