



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Vaccination and targeted therapy using liposomes : opportunities for treatment of atherosclerosis and cancer

Benne, N.

Citation

Benne, N. (2020, September 8). *Vaccination and targeted therapy using liposomes : opportunities for treatment of atherosclerosis and cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136519>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136519>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136519> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Benne, N.

Title: Vaccination and targeted therapy using liposomes : opportunities for treatment of atherosclerosis and cancer

Issue Date: 2020-09-08

Appendix

Nederlandse Samenvatting

Curriculum vitae

List of Publications

Nederlandse Samenvatting

Het immuunsysteem is de afweer van ons lichaam tegen infecties. Het kan echter ook betrokken zijn bij ziekten zoals auto-immuunziekten of kanker. T-cellen zijn van belang voor de homeostase van het immuunsysteem en zijn daarom een doelwit voor de behandeling van dergelijke ziekten. In dit proefschrift hebben we ons gericht op de behandeling van ziekten waarbij T-cellen te actief zijn (atherosclerose) of niet voldoende geactiveerd zijn (kanker) en stellen we nieuwe behandelstrategieën voor met behulp van liposomen, die in **hoofdstuk 1** werden geïntroduceerd.

In **hoofdstuk 3** wilden we het effect bestuderen van liposomale rigiditeit, één van de minst bestudeerde parameters voor nanodeeltjes, op antigeenspecifieke T-cel-responsen. Eén van de redenen dat rigiditeit niet zo uitgebreid is bestudeerd als andere fysicochemische parameters, is de moeite om het nauwkeurig te meten en een gebrek aan standaardisatie in de literatuur. We gebruikten atomic force microscopy (AFM) om de rigiditeit van individuele anionische liposomen nauwkeurig te meten. De oppervlaktelading, fosfolipide kopgroepsamenstelling, antigeengehalte en grootte van de liposomen werden gecontroleerd om veranderingen in andere fysicochemische parameters te minimaliseren. We vonden dat cholesterol in de lipide dubbellaag de rigiditeit van liposomen in de gel-toestand vermindert en die in vloeibare toestand verhoogt. Bovendien beïnvloedde de overgangstemperatuur van de fosfolipiden de algehele liposoomstijfheid. Interessant genoeg vertoonden bijna alle formuleringen een positieve correlatie tussen liposomale rigiditeit en dendritische cel (DC)-associatie. Dioleoylfosfatidylcholine (DOPC):dioleoylfosfatidylglycerol (DOPG) liposomen vertoonden echter de hoogste associatie met DC's van alle geteste formuleringen ondanks de laagste rigiditeit, hetgeen aangeeft dat liposomale rigiditeit alleen de DC-opname niet bepaalt. We hebben een significante correlatie waargenomen tussen de rigiditeit van de liposomen en de regulatoire T-cel (Treg)-responsen *in vitro* en *in vivo*. Onze bevindingen kunnen bijdragen tot een beter begrip van de factoren die de Treg-reacties beïnvloeden, en ondersteunen een rationeel ontwerp van liposomale en andere nanodeeltjes vaccinformuleringen die gericht zijn op het verbeteren van antigeenspecifieke Treg-reacties voor de behandeling van auto-immuunziekten.

Voortbouwend op de informatie in de **hoofdstukken 2 en 3**, richten de **hoofdstukken 4 en 5** zich op het gebruik van liposomen om atherosclerose te behandelen. Atherosclerose is de overheersende onderliggende pathologie van hart- en vaatziekten, waarvan wereldwijd miljoenen mensen lijden. Lipiden in de vorm van Lagedichtheidlipoproteïne (LDL) hopen zich op in de binnenste laag van middelgrote en grote slagaders, wat leidt tot chronische ontsteking. LDL kan zich modifieren om geoxideerd LDL (oxLDL) te vormen, dat immuuncellen aantrekt en de ontsteking voortzet. Sommige van deze immuuncellen, zoals monocytten, kunnen differentiëren tot macrofagen die oxLDL kunnen fagocyteren, wat leidt tot schuimcelvorming. Manipulatie van immuuncellen, met name T-cellen of schuimcellen, kan een effectieve manier zijn om atherosclerose te behandelen. In **hoofdstuk 4** hebben we liposomen ontworpen die Tregs kunnen induceren. Liposomen waren samengesteld uit distearoylfosfatidylcholine (DSPC):distearoylfosfatidylglycerol (DSPG):cholesterol (één van de meest rigide en krachtige formuleringen in **hoofdstuk 3**) en waren geladen met een van ovalbumine afgeleide CD4⁺ T-celepitop. Deze liposomen bleken *in vitro* en in muizen een hoge productie van antigeenspecifieke Tregs op te wekken in vergelijking met vrij antigeen, DSPC:dipalmitoylfosfatidylserine

(DPPS):cholesterol en DSPC:dipalmitoyltrimethylammoniumpropaan (DPTAP):cholesterol liposomen. Als een atherosclerose-specifiek antigeen hebben we ApoB100 gebruikt, het eiwitcomponent van oxLDL, waarvan al werd aangetoond dat het een relevant antigeen was voor vaccinatie tegen atherosclerose. We identificeerden een major histocompatibility complex (MHC)-II-beperkt ApoB100-afgeleid peptide, aangeduid als p3500, met behulp van een peptidomics-strategie. Het laden van p3500 in DSPG-liposomen verminderde de vorming van atherosclerotische plaques, zoals gemeten door een vermindering van de totale plaquegrootte en een toename van de plaquestabiliteit.

We beschreven ook het mechanisme achter de werking van de DSPG-liposomen. Interessant is dat anionische liposomen samengesteld uit PS lijken op apoptotische cellen, aangezien PS wordt blootgesteld op het oppervlak van apoptotische cellen. Door middel van scavenger receptoren (SR)-gemedieerde opname door APC's, kunnen PS-bevattende liposomen een ontstekingsremmend effect bemiddelen. We laten zien dat DSPG-liposomen nog effectiever worden opgenomen door DC's *in vitro* dan DPPS-liposomen. We demonstreren ook een rol voor de eiwitcorona bij Treg-inductie via SR's. In fysiologische medium *in vitro* en *in vivo* vormen eiwitten een corona om liposomen heen. We vonden een significante vermindering van opname voor zowel PG- als PS-liposomen in aanwezigheid van serum wanneer SR-gemedieerde opname door DC's werd geblokkeerd, wat niet werd waargenomen in serumvrije omstandigheden, wat suggereert dat de vorming van een eiwitcorona nodig is voor liposoom-SR interacties. We hebben ons geconcentreerd op serumproteïne-complementcomponent 1 Q (C1q), omdat is aangetoond dat het aan PS in apoptotische cellen bindt en leidt tot klaring via SRs. Interessant is dat C1q ook betrokken is bij de pathologie van atherosclerose. We hebben aangetoond dat C1q aanwezig is in het eiwit corona en bindt aan anionische liposomen. De toevoeging van C1q in serumvrije omstandigheden herstelde de opname van zowel PG- als PS-liposomen volledig, terwijl specifieke depletie van C1q in serum de opname van PG-liposomen aanzienlijk verminderde. We hebben verder waargenomen dat de toevoeging van C1q de Treg-reacties verhoogt in vergelijking met serumvrije omstandigheden, maar dit effect was niet significant. Dit suggereert dat C1q gedeeltelijk verantwoordelijk is voor de Treg-inductie van zowel DSPG- als DPPS-liposomen, maar de eiwitcorona bevat waarschijnlijk meer componenten die helpen bij het induceren van Tregs. Verder zou het heel interessant zijn om te onderzoeken of er een verband bestaat tussen liposomale rigiditeit en de eiwitcorona, iets dat we niet hebben bestudeerd.

C1q bindt niet alleen SR's, maar bindt ook aan andere eiwitten, zoals het C1q-bindende eiwit, ook bekend als p32. Deze receptor komt afwijkend tot expressie in macrofagen die in de atherosclerotische plaque aanwezig zijn. Zoals hierboven vermeld, spelen macrofagen een belangrijke rol bij de pathogenese van atherosclerose, omdat ze lipiden kunnen fagocyteren en grote lipide-rijke schuimcellen kunnen worden. Deze schuimcellen kunnen niet uit de vaatwand migreren, wat leidt tot een ophoping op de plaats van de ontsteking en de vorming van een plaque. Daarom zou een geschikte behandelingsstrategie de vorming van schuimcellen voorkomen en/of omkeren, wat ons doel was in **hoofdstuk 5**. Macrofagen kunnen cholesteroltransport over hun membraan omkeren via de ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCA1 en ABCG1. De expressie van beide transporters wordt geregeld door de lever X-receptor (LXR). Een klasse van kleine moleculen, LXR-agonisten (bijv. GW3965), kan deze receptor activeren cholesterol uit schuimcellen te pompen, waardoor migratie van deze cellen uit de plaque mogelijk

wordt. Helaas, wanneer systemisch toegediend in therapeutische doses, hebben LXR-agonisten effecten in andere organen, zoals de lever, wat leidt tot hoge triglycerideniveaus in het plasma of de lever. Lading van het LXR-agonist in liposomen kan dit probleem voorkomen. Het cyclische peptide Lyp-1 (CGNKRTRGC) bindt aan p32 en kan daarom worden gebruikt voor het targeting naar macrofagen in atherosclerotische plaques. Voor dit doel hebben we een deeltjesformulering ontwikkeld die het cyclische peptide Lyp-1 combineert met een LXR-agonist (GW3965). We hebben de kennis uit **hoofdstuk 2, 3 en 4** gebruikt om liposomen te formuleren met een lange circulatietijd en minimale immuuneffecten. Vervolgens hebben we de liposomen gefunctionaliseerd met Lyp-1, en dit leidde tot een sterk verbeterde associatie met schuimcellen *in vitro*, terwijl ze een beperkte affiniteit hadden voor macrofagen. *In vivo* zagen we retentie van liposomen in atherosclerotische plaques, en we bevestigden dat de schuimcellen in de plaques de liposomen opnemen. We hebben aangetoond dat het gebruik van een lage dosis GW3965 geladen in Lyp-1-liposomen het gehalte aan schuimcellen kan verminderen en de stabiliteit van de plaque kan verhogen, terwijl een toename van lipiden in het serum en de lever wordt vermeden. Deze bevindingen tonen aan dat het mogelijk is om het therapeutisch venster van LXR-agonisten te vergroten en kan bijdragen aan het ontwerp van andere therapieën voor atherosclerose. In het bijzonder zouden Lyp-1 gefunctionaliseerde liposomen kunnen worden gebruikt als een platform voor het afgeven van andere geneesmiddelen aan schuimcellen, zoals ontstekingsremmende geneesmiddelen.

Het laatste onderzoekshoofdstuk van dit proefschrift (**hoofdstuk 6**) richt zich op het gebruik van liposomen om kanker te behandelen, wat ook een belangrijk gezondheidsprobleem is. Kanker omvat een groep ziekten met abnormale aanhoudende celproliferatie, replicatie en overleving. T-cellen zijn ook betrokken bij kanker, omdat ze tumor-geassocieerde antigenen kunnen herkennen, echter, in tegenstelling tot atherosclerose, zijn T-celreacties bij kanker niet effectief en lijden ze aan uitputting. Zoals we in **hoofdstuk 4** hebben aangetoond, zijn DSPC:DPTAP:cholesterol liposomen effectief in het induceren van antigeenspecifieke pro-inflammatoire T-cellen en kunnen de immunrespons leveren dat nodig is om een tumor te verwijderen. In **hoofdstuk 6** wilden we deze DSPC:DPTAP:cholesterol liposomen combineren met tumorneoepitopen als een therapeutisch vaccin tegen kanker. Neoepitopen zijn zeer interessant voor behandeling; ze zijn het gevolg van niet-synonieme somatische mutaties die coderen voor nieuwe aminozuurresiduen, wat leidt tot nieuwe peptiden die kunnen worden gepresenteerd op het celoppervlak van tumorcellen. De Hannover Medical School toonde eerder aan dat het induceren van sterke pro-inflammatoire T-celreacties tegen Adpgk_{mut} (een neoepitop) gerichte kankers kon elimineren. Dit werd bereikt door DC's van muizen te isoleren, ze *ex vivo* te pulseren met antigeen en adjuvantia en ze opnieuw te injecteren. Deze DC's kunnen vervolgens de tumorspecifieke epitopen presenteren aan T-cellen en deze primen om de kankercellen te vernietigen. Om CD8⁺ T-celreacties te stimuleren, werden muizen na enige tijd geïnjecteerd met een mengsel van een agonistisch anti-CD40-antilichaam (Co), antigeen (A) en een toll-like receptor (TLR) ligand (T) Poly I:C. Helaas is *ex vivo* priming van DC's zeer arbeidsintensief en duur en verhindert toegankelijkheid. We stelden voor dat DSPC:DPTAP:cholesterol het antigeen op een eenvoudige manier *in situ* aan DC's kan afleveren. Eerst hebben we kale Adpgk_{mut}-liposomen vergeleken met liposomen die het TLR3-ligand poly (I:C), de TLR4-agonist MPLA of de stimulator of interferon genes (STING)-agonist cdiGMP bevatten. Muizen werden geprimeerd met

liposomen en gestimuleerd met CoAT. De cdiGMP-liposomen induceerden de sterkste antigeenspecifieke CD8⁺ T-celrespons, dus gingen we door met deze formulering in verdere experimenten. In een directe vergelijking presteerden cdiGMP-liposomen net zo goed als DC-CoAT-vaccinatie. We hebben ook de geschiktheid van de liposomen getest met een andere neopeitope, Alg8_{mut}. Net als bij Adpgk_{mut} verhoogde lading van Alg8_{mut} in cdiGMP-liposomen de immuunrespons aanzienlijk en leidde dit tot zeer langdurige responsen die vergelijkbaar waren met die welke werden bereikt met DC-CoAT. Vervolgens streefden we ernaar ons vaccinatieprotocol te verbeteren door CD4⁺ T-cellen te induceren door toevoeging van het CD4⁺ T-celepitope MTAG85B. We wilden ook het effect bestuderen van een lange versie van het Adpgk_{mut} peptide op CD8⁺ T-celresponsen. Het lange peptide verhoogde de CD8⁺ T-celrespons tegen het minimale epitope niet. Er was ook geen bewijs dat de door MTAG85B geïnduceerde CD4⁺ T-celactivatie de CD8⁺ T-celreacties stimuleerde. Vanwege het gebrek aan verbetering van de Adpgk_{mut}-reacties met de toevoeging van een CD4⁺ T-celepitope of een lang peptide, hebben we besloten een tumorstudie uit te voeren met alleen het minimale Adpgk_{mut}-peptide in cdiGMP-liposomen. Hier hebben we extreem hoge antigeen-specifieke responsen op het antigeen waargenomen (tot 60% van alle CD8⁺ T-cellen reageerden op het antigeen door IFN γ te produceren). We zagen tumorregressie binnen 30 dagen en 100% overleving bij muizen die de LS-CoAT-vaccinatie ontvingen. In het algemeen toont dit werk aan dat cdiGMP-liposomen een zeer krachtig platform zijn voor het laden van tumorneopeitopen om sterke antigeenspecifieke CD8⁺ T-cellen te induceren en gevestigde tumoren te elimineren.

Toekomstperspectief

In **hoofdstuk 5** hebben we een methode onderzocht om atherosclerose te behandelen door gerichte liposomen te gebruiken om een medicijn af te leveren. In de literatuur zijn gerichte liposomen toegepast bij de behandeling van kanker en om de bloed-hersenbarrière te passeren om neurologische ziekten zoals Alzheimer te behandelen. Verschillende liposomale formuleringen, waaronder gePEGylerde liposomen, zijn al veilig gebleken en zijn FDA- en EMA-goedgekeurd. Bovendien zijn gePEGylerde liposomen gebruikt om prednisolon (een ontstekingsremmend medicijn) passief af te leveren aan atherosclerotische plaques bij mensen, wat aangeeft dat er enige vertaling is van dieren naar mensen.

We hebben het belang van het ontwerpen van liposomen met specifieke fysicochemische parameters benadrukt en het effect van grootte, vorm en rigiditeit samengevat in **hoofdstuk 2**. Liposomale rigiditeit was intrigerend omdat we geen substantiële literatuur over deze parameter konden vinden. Daarom wilden we ons begrip van deze parameter vergroten en een gedetailleerd onderzoek uitvoeren naar de relatie tussen liposomale rigiditeit en Treg-responsen in **hoofdstuk 3**. Hiervoor hebben we een geoptimaliseerd protocol gepresenteerd voor het meten van de rigiditeit van liposomen met behulp van AFM. Beide hoofdstukken dragen bij aan het begrip van het effect van fysicochemische parameters van liposomen op de immuunresponsen en kunnen anderen helpen bij het ontwerpen van liposomale vaccins. Er moet ook worden opgemerkt dat liposomen van nature relatief zachte deeltjes zijn, dus het is onbekend of de waargenomen immuneeffecten van toepassing zijn op een bredere reeks van rigiditeiten. Het exacte mechanisme hoe rigiditeit de immuunrespons beïnvloedt, is nog steeds niet volledig bekend en toekomstige studies die dit in meer detail onderzoeken zouden zeer

waardevol zijn.

De inductie van antigeenspecifieke Tregs is een focus van **hoofdstukken 3 en 4**. We identificeerden een peptide afgeleid van muizen-ApoB100 voor vaccinatie, maar menselijke ApoB100 epitopen zijn beschreven door anderen, en waren succesvol tegen atherosclerose in gehumaniseerde muizen. Deze peptiden kunnen geladen worden in liposomen om hun effecten en veiligheid te verbeteren. Helaas zijn er tot nu toe geen klinische studies uitgevoerd met behulp van ApoB100-afgeleide epitopen, dus er is nog steeds een vraag over de vertaling van deze studies naar een klinische setting. Omdat veel patiënten die lijden aan atherosclerose statines gebruiken, moet ook de interactie tussen statines en peptiden en/of liposomen worden bestudeerd. Het is al gedemonstreerd dat gecombineerd gebruik van statines en LDL-nabootsende liposomen ernaar leiden dat liposomen de bloed-hersenbarrière overschreden in een *in vitro* kweekmodel, wat gevaarlijk kan zijn. Verder is met behulp van fluorescentie-anisotropie aangetoond dat sommige statines een interactie aangaan met de bilaag van liposomen en hun vloeibaarheid kunnen veranderen, en daarmee hun immunogeniciteit. In tegenstelling tot onze studie met Lyp-1 liposomen, werden de tolerogene liposomen in **hoofdstuk 4** ingevoerd terwijl atherosclerose werd geïnduceerd in de muizen; het zou klinisch relevant zijn om de liposomen toe te dienen bij muizen die al atherosclerose hebben.

Immuunmodulatie was ook de focus van **hoofdstuk 6**, maar in plaats van de immuunrespons op een antigeen te onderdrukken, wilden we het juist verbeteren door het gebruik van kationische liposomen. Immunotherapie tegen kanker via DC's of T-cellen en immunotherapie tegen neoantigenen is al enkele jaren onderzocht. Wij stellen dat immuuntherapie via liposomen een snellere, goedkopere behandelingsstrategie is. Nanodeeltjes, waaronder liposomen, zijn inderdaad al effectief gebleken bij kankertherapie en ons werk draagt bij aan dit bewijs. Technieken om antigenen te identificeren die specifiek zijn voor ziekten, inclusief het in dit proefschrift geïdentificeerde atherosclerose-antigeen p3500, zijn in de laatste jaren verbeterd. In combinatie met het vermogen van liposomen om een breed scala aan epitopen te laden, zouden liposomen een belangrijke speler kunnen zijn in de toekomst van gepersonaliseerde therapieën. Het moet gemeld worden dat, hoewel we geen toxiciteit hebben waargenomen in onze dierstudies, kationische fosfolipiden bij hoge doses toxiciteit induceren in *in vivo* diermodellen en *in vitro* menselijke cellen. Daarom moet de verdere ontwikkeling van deze liposomen er altijd naar streven de dosis van de kationische fosfolipiden in de liposomen te minimaliseren. Om door te gaan naar klinische proeven moeten meer toxiciteitsstudies worden uitgevoerd in diermodellen om te testen of de liposomen veilig zijn om te gebruiken, op korte of lange termijn.

Afgezien van de noodzaak om de veiligheid van de liposomen voor klinisch gebruik te testen, vereist testen bij mensen grote hoeveelheden liposomen en de geladen inhoud (medicijn, peptide, adjuvans). Schaalvergroting is niet alleen potentieel duur (hoewel inkapseling van een verbinding in een (gericht) nanodeeltje de vereiste dosis en dus kosten sterk verlaagt), maar het kan de fysicochemische eigenschappen van de liposomen veranderen. Dit geldt ook voor de GMP-productie van liposomen. Het is aangetoond dat methoden zoals micro-fluidics en ethanolinjectie reproduceerbaar grote hoeveelheden liposomen kunnen produceren onder GMP-omstandigheden. Er moet echter een gedetailleerde evaluatie van het effect van de productiemethode op liposomale eigenschappen worden uitgevoerd.

