



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Liposomes as delivery system for allergen-specific immunotherapy

Leboux, R.J.T.

Citation

Leboux, R. J. T. (2021, November 16). *Liposomes as delivery system for allergen-specific immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3240101>

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/1887/3240101>

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

Chapter 8

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift is de mogelijke toepassing van liposomen als hulpstof in subcutane immunotherapie tegen berkenpollen allergie bestudeerd. Dit is gedaan door het dominante allergeen in berken pollenallergie, Bet v 1, op verschillende manieren aan liposomen te adsorberen. Uiteindelijk heeft dit geleid tot het ontwikkelen van een nieuwe methode om eiwitten of peptiden aan liposomen te binden. Deze methode is gebaseerd op de specifieke interactie tussen twee peptiden, die een dubbele helix vormen. Conjugatie van Bet v 1 aan liposomen zorgde na subcutane toediening voor een sterkere immuunreactie in muizen in vergelijking van Bet v 1 gebonden aan liposomen via standaardmethoden.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe het beladen van positief geladen liposomen met eiwitten de fysisch-chemische eigenschappen en stabiliteit van de deeltjes beïnvloedt. Bovendien wordt de opgewekte immuunrespons van de verschillende methoden vergeleken. Bet v 1 werd aan de buitenkant van de liposomen geadsorbeerd, aan de binnenkant verpakt (ingebouwd), en een combinatie van de twee werd bekeken. De deeltjesgrootte en de spreiding van de deeltjesgrootte namen toe, bij een hogere dosis Bet v 1 aan de buitenkant, maar dit gebeurde niet als Bet v 1 aan de binnenkant zat, of bij een combinatie van de twee. In alle gevallen werd boven een eiwit/lipide ratio van 0.15 (gewicht/gewicht) aggregatie van de liposomen waargenomen. Het adsorberen van Bet v 1 aan de buitenkant, en ingebouwd in liposomen, werd minder efficiënt bij een toenemende dosis van Bet v 1.

Muizen die geïmmuniseerd werden met de verschillende liposoom-formuleringen produceerde meer Bet v 1-specifieke antistoffen dan muizen die geïmmuniseerd werden met colloïdaal aluminium hydroxide, de hulpstof die gebruikt wordt in immunotherapie tegen berkenpollen allergie. De combinatie van Bet v 1 ingebouwd in de liposomen en geadsorbeerd aan het liposoomoppervlak wekte de meeste antistoffen op. De antistoffen die werden opgewekt, waren IgG1, maar niet IgG2a. IgG1 wordt geassocieerd met een helper T-cellen van type (Th)-2-gemedieerde immuunreactie, terwijl voor allergie-specifieke immunotherapie een gemengde Th-1 en regulatoire T-cel (Treg) reactie gewenst is. Deze laatste wordt beter opgewerkt door negatief geladen liposomen. Vandaar dat in **hoofdstuk 3 en 4** negatief geladen liposomen gebruikt werden.

Eerst werd het effect van lipide-bilaag stijfheid bestudeerd. Er is echter geen standaardmethode beschikbaar om eenvoudig de stijfheid van de lipide-bilaag te meten. In deze studie werd atoomkrachtmicroscopie (AFM) gebruikt om de stijfheid van een reeks negatief geladen liposomen met verschillende samenstelling te meten. Deze verschillende liposomen hadden een vergelijkbare deeltjesgrootte, oppervlaktechemie en belading van peptide. Het enige verschil was de verzadiging van de fosfolipiden en/of de toevoeging van cholesterol.

Dit lipide verhoogt de stijfheid van vloeibare membranen, maar verlaagt juist de stijfheid van gel-achtige membranen. Van de reeks liposomen die gemaakt was, werd de stijfheid gemeten, maar ook de opname door dendritische cellen (DCs) en de mate van Treg activatie in muizen en celkweek. Dit toonde aan dat liposomen met hogere stijfheid beter worden opgenomen door DCs en meer Treg activatie veroorzaakten. Hulpstoffen die meer Treg activatie opwekken, zullen waarschijnlijk beter zijn voor immunotherapie.

In **hoofdstuk 4** werd het verschil in opname door DCs tussen twee eiwitten (ovalbumine en Bet v 1) met en zonder liposomen (positief of negatief geladen) na injectie in humane huid vergeleken. Hiervoor werd de opname door dendritische cellen uit de huid bestudeerd in een *ex vivo* huid model. Grote verschillen in opname werden waargenomen tussen de verschillende eiwitten. Ovalbumine werd heel goed opgenomen door alle verschillende dendritische cellen, in tegenstelling tot Bet v 1. Door de eiwitten in te bouwen in liposomen werd de opname van Bet v 1 drastisch verhoogd ($>10\times$), echter de opname van ovalbumine nam af. Dit effect was zowel bij positief als negatief geladen liposomen te zien. Bovendien werden negatief geladen liposomen beter opgenomen dan positief geladen liposomen. Dit was onverwacht, omdat juist wordt aangenomen dat positief geladen deeltjes beter worden opgenomen door dendritische cellen.

In de eerdere hoofdstukken van dit proefschrift is al gebleken dat het inbouwen van antigenen in liposomen vaak geen efficiënt proces is. Voor positief geladen liposomen ging 60-80% van het Bet v 1 verloren tijdens de zuivering. Voor negatief geladen liposomen was dit verlies nog groter. Om dit probleem op te lossen, werd in **hoofdstuk 5** een nieuwe methode beschreven om antigenen met liposomen te associëren. Deze methode is eerst met een model antigeen (peptide) gekarakteriseerd, en vervolgens in **hoofdstuk 6** met Bet v 1 beschreven. Het antigeen wordt aan liposomen geadsorbeerd door gebruik te maken van complexvorming tussen 2 complementaire peptiden. Deze peptiden vormen een zogenaamd coiled-coil motief. Eén van deze peptiden (peptide K) werd geconjugéerd aan cholesterol resulterend in een peptide-amfifiel (CPK) welke verankerd werd in het membraan van positief geladen liposomen. Het complementaire peptide (peptide E) werd geconjugéerd aan twee verschillende antigenen "OVA323" en "OVA257" resulterend in respectievelijk pepE-OVA323 en pepE-OVA257. De affiniteit van de nieuwe pepE-varianten met CPK-liposomen was hoog ($K_d \approx 100-400$ nM) in vergelijking met adsorptie door elektrostatische interacties ($K_d > 10^5$ nM). Bovendien bleven antigenen die via coiled coils aan liposomen waren gebonden bij elkaar in celkweek medium en na injectie in zebravislarven, in tegenstelling tot antigenen die zonder coiled coils aan liposomen waren gebonden. Ook zorgden coiled coil-gebonden antigenen aan

liposomen voor een 4 keer zo hoge activatie van CD4⁺ T-cellen *in vitro*. Bovendien werd in muizen die geïmmuniseerd werden met coiled coil-geïmmobiliseerd antigeen meer interferon gamma (IFN- γ) en interleukine (IL) 10 geproduceerd door CD4⁺ T-cellen dan muizen die antigeen via elektrostatische interacties aan liposomen geplakt waren. Deze combinatie van IFN- γ en IL-10, die kenmerkend zijn voor respectievelijk een Th1 en Treg-gestuurde immuunreactie, is bij uitstek interessant om allergieën te bestrijden.

In **hoofdstuk 6** werd in *E. coli* een fusie-eiwit geproduceerd van pepE met Bet v 1, om Bet v 1 ook via coiled coils aan positief geladen liposomen te binden. Deze liposomen waren een factor 10 minder allergeen dan vrij Bet v 1. Dit is belangrijk om bijwerkingen van het preparaat te voorkomen. Daarnaast werden muizen geïmmuniseerd met positief geladen liposomen met Bet v 1 aangeplakt via elektrostatische interacties of coiled coil. Dit werd vergeleken met de huidige therapie voor berken pollenallergie, namelijk aluminium hydroxide geadsorbeerd Bet v 1. Muizen geïmmuniseerd met coiled coil gebonden Bet v 1 produceerde de meeste IgG1 en IgG2a. Dit was significant hoger dan Bet v 1 gebonden aan liposomen via elektrostatische interacties, welke meer antilichamen produceerde dan de muizen die met aluminium geïmmuniseerd werden. Deze resultaten laten duidelijk zien dat het binden van een antigeen aan liposomen via coiled coil interacties een sterke immuunreactie kan opwekken.

In dit proefschrift is aangetoond dat zowel positief als negatief geladen liposomen gebruikt kunnen worden als verpakking van eiwit-antigenen. Bovendien hebben we een nieuwe methode ontwikkeld om antigenen aan liposomen te plakken. Deze methode is getest met verschillende antigenen (peptiden en eiwit) en bleek voor allemaal goed te werken. Bovendien zorgde deze methode voor een sterkere binding dan via conventionele binding (via elektrostatische interacties). Antigenen die via deze manier aan positief geladen liposomen gebonden waren, zorgden ook voor een sterkere immuunreactie dan antigeen dat via elektrostatische interacties geplakt was. Bovendien is de immuunrespons die opgewekt werd, een gemengde response van Th1 en Treg, interessant voor de toekomstige behandeling van allergieën via immunotherapie.

