



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Liposome-based vaccines for immune modulation: from antigen selection to nanoparticle design

Lozano Vigario, F.

Citation

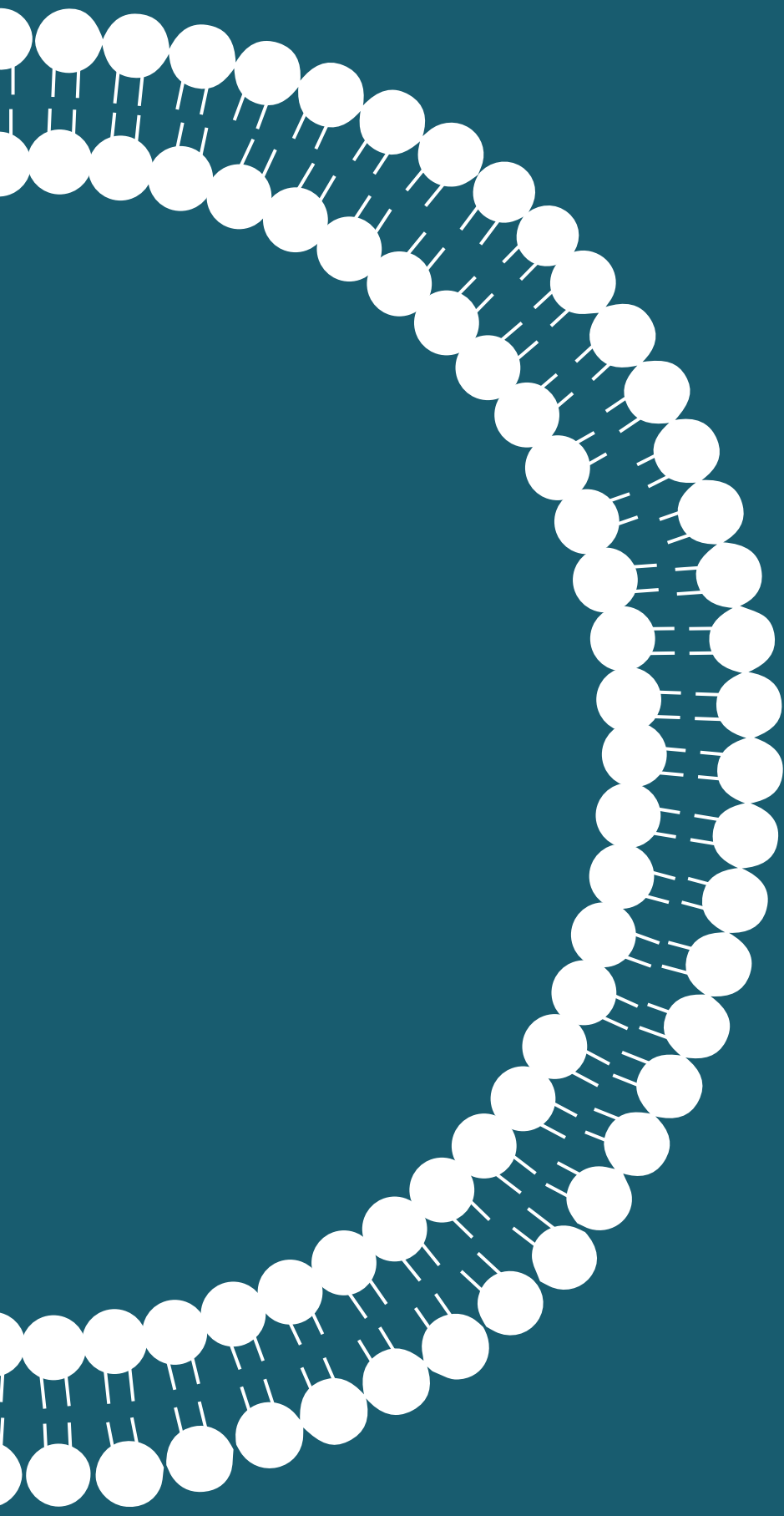
Lozano Vigario, F. (2024, September 10). *Liposome-based vaccines for immune modulation: from antigen selection to nanoparticle design*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4082551>

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/1887/4082551>

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



Appendices

Nederlandse Samenvattig

Curriculum Vitae

List of Publications

NEDERLANDSE SAMENVATTIG

Het immuunsysteem is een verzameling organen, cellen en moleculen die het organisme verdedigen tegen ziekteverwekkers of stoffen die als vreemd worden herkend. Het kan grofweg worden ingedeeld in twee armen, de aangeboren en de adaptieve immuniteit. De aangeboren immuniteit is de eerste verdedigingslinie tegen een infectie, wordt snel opgebouwd, maar is niet antigeen-specifiek en kan geen immunologisch geheugen genereren. De adaptieve immuniteit daarentegen is wel antigeen-specifiek, maar heeft meer tijd nodig om zich te ontwikkelen. Dit type immuunrespons kan een immunologisch geheugen genereren dat zich sneller zal ontwikkelen bij herinfectie met dezelfde ziekteverwekker. Antigeen-presenterende cellen (APCs) vormen de verbinding tussen aangeboren en adaptieve immuniteit. Deze cellen kunnen antigenen vangen, verwerken en op hun oppervlak presenteren aan andere cellen van het adaptieve immuunsysteem, zoals T-cellen, waardoor de adaptieve immuunrespons op gang komt. Een over- of onderactivatie van het immuunsysteem ligt aan de basis van veel ziekten. Bij auto-immuunziekten wordt de natuurlijke tolerantie ten opzichte van zelfantigenen doorbroken, wat bijvoorbeeld leidt tot de vernietiging van β -cellen bij type 1-diabetes (T1D) of de myelineschede van neuronen bij multiple sclerose (MS). Bij andere veel voorkomende ziekten, zoals atherosclerose de belangrijkste oorzaak van hart- en vaatziekten, is er ook een ontstekingsreactie tegen zelfantigenen betrokken bij de etiologie van de ziekte. In andere gevallen kan het immuunsysteem falen in het genereren van een afdoende immuunrespons tegen een ziekteverwekker, wat leidt tot een wijdverspreide infectie die fataal kan zijn. In dit proefschrift laten we zien dat liposomen, een soort nanodeeltjes, kunnen worden toegepast om de immuuntolerantie bij auto-immuunziekten te herstellen en beschermende immuunreacties tegen infecties te activeren.

Nanodeeltjes kunnen worden gebruikt als afgiftesysteem voor zowel kleine moleculen als macromoleculen zoals eiwitten, peptiden of oligonucleotiden. Dit proefschrift richt zich op het gebruik van liposomen, nanometrische blaasjes gevormd door een fosfolipidenbilaag die een waterige kern omsluit. Liposomen zijn zeer veelzijdige afgiftesystemen die zowel hydrofobe als hydrofiële ladingen kunnen vervoeren, respectievelijk geladen in de fosfolipidenbilaag of in de waterige kern. Bovendien kan het biologische effect van liposomen worden gecontroleerd door hun fysisch-chemische eigenschappen, zoals grootte, vorm, stijfheid of oppervlaktelading, nauwkeurig af te stellen. Van de verschillende toepassingen van liposomen is vooral de toediening van antigenen interessant. Liposomen kunnen antigenen beschermen tegen afbraak en ze kunnen de antigeenafgifte richten op gespecialiseerde cellen zoals APCs. Liposomen kunnen lading transporteren naar APCs, zoals dendritische cellen (DCs), door gebruik te maken

van de intrinsieke hoge opname capaciteit van deze cellen. De manier waarop DCs het antigeen presenteren zal het type adaptieve immuunrespons bepalen. Bijvoorbeeld, de presentatie van antigenen in de context van een hoge expressie van co-stimulatoire moleculen zoals CD86, CD80 of CD40 en pro-inflammatoire cytokines zal de immuunrespons doen overhellen naar een pro-inflammatoire respons gemedieerd door Th1 of Th17 lymfocyten, noodzakelijk om virale en bacteriële infecties te bestrijden. Aan de andere kant zal de presentatie van antigenen door DCs in de context van lage niveaus van co-stimulatoire moleculen en hoge niveaus van ontstekingsremmende cytokinen een tolerogene respons induceren die voornamelijk gemedieerd wordt door T-regulerende cellen (Tregs). Het gebruik van nanodeeltjes voor de co-bezorging van antigenen en moleculen die de expressie van co-stimulatoire eiwitten moduleren is daarom niet alleen een veelbelovende strategie om toe te passen in conventionele profylactische vaccins, maar ook bij tolerogene vaccins om de immuunhomeostase bij auto-immuunziekten te herstellen.

Hoewel lipide nanodeeltjes op grote schaal en met succes zijn gebruikt in de SARS-CoV2 vaccins tegen de COVID-19 pandemie, zijn er nog veel onbekendheden die verhinderen dat op nanodeeltjes gebaseerde therapieën en vaccins hun volledige potentieel realiseren. In dit proefschrift proberen we licht te werpen op enkele hiaten in de kennis op dit gebied.

In **hoofdstuk 2** bespreken we tolerogene strategieën tegen veel voorkomende auto-immuunziekten zoals multiple sclerose (MS) en type 1 diabetes (T1D). We vatten de lessen samen die kunnen worden geleerd uit de inspanningen om deze therapeutische benaderingen naar de kliniek te brengen en de uitdagingen om tolerogene therapieën toe te passen op atherosclerose, een van de meest voorkomende chronische ziekten in de westerse wereld. Atherosclerose is een ontstekingsziekte van de slagaders, gekenmerkt door infiltratie en ophoping van lipoproteïnen met een lage dichtheid (LDL) in de subendotheliale ruimte van de slagaders, waardoor atheroscleroseplaques worden gevormd. De ophoping van LDL-deeltjes veroorzaakt een ontstekingsreactie die leidt tot verdere groei van de plaque. Deze plaques kunnen de bloedstroom naar bepaalde delen van het lichaam beperken of scheuren waardoor een bloedprop ontstaat, wat leidt tot de meest voorkomende klinische manifestatie van atherosclerose in de vorm van een myocardinfarct of beroerte. Klinische studies hebben aangetoond dat systemische immuunsuppressie de incidentie van cardiovasculaire voorvallen aanzienlijk kan verminderen door de ontstekingsreactie te verminderen, maar ten koste van een hoger risico op dodelijke infecties. Deze neveneffecten zijn nauwelijks aanvaardbaar voor de preventie van hart- en vaatziekten. De inductie van antigeen-specifieke immuuntolerantie zou een betere aanpak zijn en dit is reeds onderzocht in klinische

studies tegen andere auto-immuunziekten. Deze therapeutische strategieën zijn veilig gebleken en werden goed verdragen in klinische studies, maar hun doeltreffendheid hangt af van de zorgvuldige keuze van de doelantigenen, de dosis en de toedieningsweg.

De studie van antigeen-specifieke immuunreacties in atherosclerose is essentieel voor de ontwikkeling van tolerogene vaccins tegen de ziekte, omdat de antigenen die pro-atherogene immuunreacties veroorzaken niet goed gekarakteriseerd zijn. In **hoofdstuk 3** gebruiken we immunopeptidomics om peptiden, gepresenteerd door HLA-klasse II moleculen, rechtstreeks uit atherosclerotische plaques van patiënten die een endarterectomie ondergaan, te isoleren en te identificeren. We identificeerden 20 epitopen afkomstig van ApoB100, het belangrijkste eiwit in LDL-deeltjes, en toonden aan dat 22% van de atherosclerosepatiënten detecteerbare niveaus van CD4⁺ T-cellen heeft die reageren op deze epitopen. Interessant genoeg correleert het niveau van de CD4⁺ T cel respons in deze subset van patiënten positief met de kwetsbaarheid van de plaque. Verdere karakterisering van deze cellen toonde aan dat ze IL-17 en IL-10 produceren, maar ook andere cytokinen zoals IL-5, IL-9 of IL-6, wat suggereert dat de ApoB100-specifieke T-cel populatie geen uniek fenotype heeft. Het herstellen van de immunologische balans door het induceren van ApoB100-specifieke Tregs of het voorkomen van Th1/Th17-polarisatie met behulp van tolerogene nanodeeltjes geladen met de hier geïdentificeerde epitopen zou derhalve een veelbelovende therapeutische strategie tegen hart- en vaatziekten kunnen zijn.

Naast de definitie van de doelantigenen moet het toedieningssysteem worden geoptimaliseerd voor tolerantie-inductie bij de mens. In **hoofdstuk 4 hebben** we aangetoond dat voor de vertaling van preklinische modellen naar patiënten de aanwezigheid van een tolerogene molecule zoals 1 α ,25-dihydroxyvitamineD3 (vitamineD3) nodig kan zijn. Liposomen geladen met vitamine D3 waren in staat om *in vitro* een tolerogeen fenotype te induceren in humane monocyt-afgeleide DCs en deze tolerogene DCs waren in staat om FoxP3⁺ CD25⁺ Tregs te induceren die ook IL-10 produceerden, een belangrijke ontstekingsremmende cytokine. Bovendien remden deze tolerogene DCs de polarisatie van T cellen naar de pro-inflammatoire subsets Th1 en Th17. Tot slot laten we ook zien dat intradermale toediening van liposomen geladen met vitamine D3 in *ex vivo* humane huid de selectieve migratie induceerde van CD14⁺ dermale DCs, waarvan eerder is aangetoond dat ze Tregs kunnen induceren. De volgende stappen in de klinische vertaling van peptide-gebaseerde liposoomvaccins vereisen de evaluatie van antigeen-specifieke T celresponsen in *ex vivo* humane modellen zoals de intradermale huidinjecties die in dit hoofdstuk zijn getoond.

Nadat we hebben aangetoond dat DSPC:DSPG:Cholesterol liposomen met vitamine D3 potentieel toepasbaar zijn bij mensen, willen we in **hoofdstuk 5** het probleem van de productie van deze formuleringen aanpakken. Traditionele laboratoriummethoden voor de bereiding van liposomen hebben weinig opschalingspotentieel. De laboratoriumschaalmethode om liposomen te bereiden is arbeidsintensief, bestaat uit meerdere stappen en vereist veel energie, waardoor de productie van grote batches formuleringen erg moeilijk is. De productie van liposomen met microfluidica is daarentegen een continu proces in één stap. In hoofdstuk 5 stellen we het gebruik voor van een herbruikbare glazen visgraat micromixer voor de bereiding van DSPC:DSPG:Cholesterol liposomen. Met behulp van dit systeem laten we zien dat de gemiddelde deeltjesgrootte van de liposomen nauwkeurig kan worden afgesteld door de stromingscondities te veranderen en dat peptiden met een breed scala aan lading en hydrofobiciteit kunnen worden ingekapseld. Verder laten we zien dat de inkapselingsefficiëntie van het tolerogene adjuvans vitamine D3 in DSPC:DSPG:Cholesterol liposomen aanzienlijk verhoogd was in de formuleringen bereid met microfluidics vergeleken met de conventionele methode. De biologisch actieve vorm van vitamine D3 is duur, daarom is de toename in efficiëntie van de inkapseling een belangrijk voordeel. De productie van DSPC:DSPG:Cholesterol liposomen met microfluidics vergemakkelijkt de productie van deze formuleringen onder Good Manufacturing Practice (GMP) omstandigheden, een eerste vereiste om deze tolerogene nanodeeltjes dichter bij de kliniek te brengen.

Naast de opname van tolerogene moleculen, zoals vitamine D3, heeft eerder onderzoek aangetoond dat de stijfheid van de nanodeeltjes een belangrijke fysisch-chemische parameter is die de tolerogene capaciteit van liposomen bepaalt. De lipidensamenstelling en de aanwezigheid van cholesterol in de bilaag bepaalt de stijfheid van het nanodeeltje, maar kan ook andere eigenschappen beïnvloeden, zoals de eiwitcorona, de verzameling eiwitten die in een biologische vloeistof interacteren met het liposoomoppervlak. In **hoofdstuk 6** gebruiken we een hybride nanodeeltje dat bestaat uit een PLGA-deeltje bedekt met een DOPC:DOPG-lipidenbilaag (DOPG/PLGA hybriden) om een zeer stijf nanodeeltje te verkrijgen, maar met een vloeibare lipidenlaag. We laten zien dat deze deeltjes weliswaar het antigeen kunnen afleveren aan APCs en Treg-responsen kunnen opwekken *in vitro*, maar dat ze er niet in slagen hetzelfde effect te bereiken *in vivo*. Hoewel eerdere studies hebben aangetoond dat stijve anionische liposomen de ontwikkeling van atherosclerose in muizen kunnen stoppen, hadden deze hybride deeltjes geen effect op de progressie van atherosclerose of de samenstelling van de plaque. We stelden de hypothese dat het *in vivo* gedrag van deze lipide nanodeeltjes meer beïnvloed wordt door de proteïne corona dan door de stijfheid van de deeltjes. De studie van de rol van verschillende eiwitten in de opname van nanodeeltjes onthulde dat ApoB100 de celopname zou

kunnen stimuleren in formuleringen met een DOPC:DOPG lipidenbelaag, ongeacht hun stijfheid, terwijl het complementeiwit C1q de belangrijkste mediator van opname is voor DSPC:DSPG:Cholesterol liposomen, zoals eerder gemeld. Dit hoofdstuk laat de complexiteit zien van het toewijzen van specifieke fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes aan een bepaald biologisch effect. Toekomstige studies moeten een allesomvattende aanpak volgen om het effect van kleine veranderingen in de fosfolipidensamenstelling op zowel de fysisch-chemische eigenschappen van het nanodeeltje, de proteïne corona samenstelling en hun biologische effect te bepalen.

In **hoofdstuk 7** van dit proefschrift richten we ons op de andere belangrijkste toepassing van vaccins op basis van liposomen, de inductie van beschermende immuunresponsen tegen virussen. Op het gebied van vaccins tegen respiratoire virussen zoals coronavirus en influenza is er behoefte aan subunitvaccins die cellulaire immuunresponsen lokaal in de longen kunnen induceren. Kationische liposomen zijn eerder bestudeerd voor hun immuunactiverende eigenschappen en deze afgiftesystemen bieden voordelen voor intranasale vaccinatie omdat de elektrostatistische interactie met het negatief geladen slijmvliesoppervlak de absorptie van de formulering verbetert. In dit hoofdstuk presenteren we een subunitvaccinformulering op basis van kationische liposomen geladen met het adjuvans cyclisch dimeer guanosinemonofosfaat (c-di-GMP) en verschillende van influenza en SARS-CoV2 afgeleide antigenen. Een snel start- en boost-immunisatieregime met deze formulering induceert krachtige en langdurige CD8⁺ T-celresponsen in muizen. Vergeleken met intraveneuze toediening, induceerde een eerste intranasale toediening met deze vaccinformulering meer gebalanceerde systemische en longspecifieke immuunresponsen, en wat nog belangrijker is, deze toedieningsroute maakte de inductie van geheugen CD8⁺ T celresponsen in de longen mogelijk. Tot slot laten we zien dat vaccinatie met deze liposomen leidt tot een vermindering van de virale belasting van de longen na een uitdaging met influenzavirus. De inductie van een beschermende immuunrespons met behulp van een versneld 'prime-boost'-regime kan essentieel zijn voor een effectieve en snelle immunisatie van de bevolking als reactie op zich snel verspreidende virale infecties van de luchtwegen, zoals SARS-CoV2 en influenza.

Concluderend toont dit proefschrift de veelzijdigheid van liposomen om zowel tolerogene immuunreacties te induceren in de context van ontstekings- of auto-immuunziekten als beschermende immuunreacties tegen infecties. We behandelen enkele van de uitdagingen in liposoomtherapieën en proberen kritieke hiaten in de kennis op dit gebied te overbruggen. In het algemeen benadrukt dit proefschrift het potentieel van op liposomen gebaseerde immuuntherapieën tegen auto-immuunziekten en op het gebied van profylactische vaccins, en zet aan tot verder onderzoek om de klinische vertaling van deze formuleringen te bevorderen.

