



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lipid nanoparticle technology for mRNA delivery: bridging vaccine applications with fundamental insights into nano-bio interactions

Escalona Rayo, O.

Citation

Escalona Rayo, O. (2026, January 20). *Lipid nanoparticle technology for mRNA delivery: bridging vaccine applications with fundamental insights into nano-bio interactions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4287230>

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/1887/4287230>

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

Nederlandse samenvatting

Lipide-nanodeeltjestechnologie voor mRNA-afgifte: een brug slaan tussen vaccinatietoepassingen met fundamentele inzichten in nano-bio-interacties

Lipide nanodeeltjes (LNP's) hebben de doorbraak van mRNA-vaccins mogelijk gemaakt, zoals die welke zijn gebruikt tegen COVID-19, desondanks blijft hun bredere therapeutische toepassing beperkt door uitdagingen op het gebied van afleveringsefficiëntie, targeting en mechanistisch begrip. Het hoofddoel van dit proefschrift was het bevorderen van het rationele ontwerp en de functionele optimalisatie van LNP-gebaseerde mRNA-afgiftesystemen voor therapeutische en vaccinatoepassingen, door systematisch te evalueren hoe de samenstelling van LNP's de afleveringsprestatie en immuunactivatie beïnvloedt, door innovatieve immunisatiestrategieën te ontwikkelen om antigeenspecifieke responsen te versterken, en door te onderzoeken hoe LNP-chemie de biodistributie en interacties met macrofagen beïnvloedt—waaronder opname en intracellulair routes—met gebruik van zowel celkweek- als zebravismodellen. Tot slot werden geavanceerde beeldvormingstechnieken—zoals expansiemicroscopie gecombineerd met bioorthogonale click-chemie—opgezet met als doel de subcellulaire lokalisatie van LNP-ioniseerbare lipiden op superresolutieniveau in kaart te brengen.

mRNA-vaccins geformuleerd in LNP's hebben de vaccinologie getransformeerd en bieden een veelzijdig platform voor snelle, schaalbare en effectieve immunisatie. Een belangrijke beperking is echter de zwakke correlatie tussen *in-vitro*-potentie en *in-vivo*-effectiviteit, wat het rationele ontwerp van LNP-mRNA-formuleringen bemoeilijkt. Daarnaast beperkt de intrinsiek lage immunogeniciteit van veel tumorantigenen de effectiviteit van mRNA-gebaseerde kankervaccins. Het hier gepresenteerde werk adresseert deze uitdagingen door te onderzoeken hoe lipidenchemie mRNA-afgifte beïnvloedt in verschillende biologische contexten en door nieuwe vaccinatiestrategieën te verkennen die gericht zijn op het versterken van immuunresponsen.

Ioniseerbare lipiden worden beschouwd als de centrale bepalende factoren voor de functie van mRNA-LNP's, maar hun precieze rol in het moduleren van biologische prestaties—zoals inkapselingsefficiëntie, endosomale ontsnapping, biodistributie en immunogeniciteit—blijft onvolledig begrepen. In **Hoofdstuk 2** vergeleken we systematisch verschillende ioniseerbare lipiden en ontdekten we dat, hoewel ze allemaal nanodeeltjes vormden met vergelijkbare

fysisch-chemische eigenschappen en efficiënte mRNA-inkapseling, hun biologische activiteit uiteenliep afhankelijk van de experimentele context. Bepaalde ioniseerbare lipiden leken *in vitro* effectiever in het stimuleren van eiwitexpressie en T-celproliferatie, maar deze verschillen werden niet consistent weerspiegeld *in vivo*, waar eiwitexpressie en immuunresponsen andere patronen vertoonden. Immunisatiestudies toonden bovendien aan dat alle klinisch relevante ioniseerbare lipiden sterke antigeenspecifieke T-celresponsen opwekten, ongeacht hun *in-vitro* profiel. Deze resultaten onderstrepen de beperkte voorspellende waarde van celweekassays voor *in-vivo*-prestaties en benadrukken het belang van evaluatie van mRNA-LNP's in fysiologisch relevante modellen.

Voortbouwend hierop behandelde **Hoofdstuk 3** een van de centrale uitdagingen in de ontwikkeling van mRNA-gebaseerde kankervaccins: de lage immunogeniciteit van tumorantigenen. Hier introduceerden we een heteroloog prime-boost-schema dat antigeen-coderende mRNA-LNP's combineert met boosters op basis van costimulerende agonisten. Deze aanpak versterkte de antigeenspecifieke T-celresponsen aanzienlijk, verbeterde hun duurzaamheid en liet zien dat lipidesamenstelling weefselspecifieke immuunuitkomsten kan sturen. LNP-gemedieerde afgifte van mRNA dat codeert voor costimulerende moleculen bood een alternatief voor antilichaam-gebaseerde stimulatie en versterkte de activatie van effector-T-cellen, zij het zonder het genereren van duurzame geheugenresponsen. Samen tonen deze bevindingen aan dat zowel lipidenchemie als vaccinatiestrategie sleutelparameters zijn voor de potentie en kwaliteit van mRNA-LNP-vaccins.

Het tweede deel van dit proefschrift benadrukt het belang van het bestuderen van nano–bio-interacties om beter te begrijpen hoe LNP-samenstelling de biologische prestaties van mRNA-vaccins en therapeutica bepaalt. Aangezien processen zoals cellulaire opname en endosomale ontsnapping slecht begrepen blijven, zijn nieuwe hulpmiddelen nodig om het gedrag van LNP's binnen cellen te volgen. Om dit aan te pakken ontwikkelden we een chemische strategie om ioniseerbare lipiden direct in cellen te visualiseren, wat een platform biedt om mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan endosomale ontsnapping en andere kritieke stappen in LNP-gemedieerde mRNA-afgifte.

Een dieper begrip van nano–bio-interacties is essentieel voor de verdere ontwikkeling van mRNA-LNP-therapeutica, aangezien de fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes hun biologische lot sterk beïnvloeden. Deze interacties bepalen cellulaire opname, intracellulaire routes en uiteindelijk de efficiëntie van mRNA-afgifte. Van de vele betrokken

celtypen zijn macrofagen van bijzonder belang vanwege hun centrale rol in immuniteit, hun vermogen om nanodeeltjes te fagocyteren en hun functie als zowel biologische barrières als therapeutische doelwitten. In **Hoofdstuk 4** varieerden we systematisch de chemie van helperlipiden—anionisch, neutraal en kationisch—om te beoordelen hoe lading macrophage-targeting en transfectie beïnvloedt. Kationische helperlipiden resulteerden consistent in de hoogste efficiëntie van mRNA-afgifte, wat correleerde met verbeterde endosomale ontsnapping en duidelijke veranderingen in de LNP-nanostructuur; een hogere concentratie kationische lipiden kan de vorming van lipidenstructuren met kubische fase bevorderen, die bekend staan om het faciliteren van membraandisruptie en verbeterde transfectie. Biodistributiestudies bevestigden verder dat LNP-formuleringen met kationische helperlipiden hogere niveaus van macrofaagtransfectie bereikten, maar gebruik bij hoge concentraties roept zorgen op over mogelijke toxiciteit en immunostimulatie, wat wijst op de noodzaak van een zorgvuldige balans tussen effectiviteit en veiligheid in toekomstige mRNA-LNP-ontwerpen.

Hoofdstuk 5 onderzoekt een chemische modificatiestrategie om klikbare ioniseerbare lipiden te creëren door introductie van een terminale alkyn-groep in de hydrofobe staart. Deze subtiele modificatie behield de fysisch-chemische eigenschappen en biologische prestaties van LNP's, terwijl efficiënte bio-orthogonale conjugatie met azide-gekoppelde fluorescerende kleurstoffen via click-chemie mogelijk werd. Met deze aanpak maakten de gemodificeerde ioniseerbare lipiden gevoelige en specifieke visualisatie van mRNA-LNP's binnen cellen mogelijk, waarbij opnamekinetiek, vesiculaire lokalisatie en progressieve desintegratie voorafgaand aan endosomale ontsnapping en mRNA-afgifte zichtbaar werden. Co-localisatiestudies valideerden ze als betrouwbare markers voor intacte LNP's, en aanvullende hoofdgroep substituties met reactieve groepen verbeterden lipidenretentie tijdens celpermeabilisatie, wat de nauwkeurigheid van lokalisatie-analyse verhoogde. In het geheel vormen multifunctionele ioniseerbare lipiden een veelzijdig beeldvormingsplatform voor het volgen van LNP-gedrag, met het potentieel om de mechanismen te ontrafelen die mRNA-LNP-afgifte *in vitro* en *in vivo* bepalen.

Ten eerste liet een systematische evaluatie van ioniseerbare lipiden zien hoe variaties in samenstelling de fysisch-chemische eigenschappen, cellulaire opname, eiwitexpressie en immuunactivatie kritisch beïnvloeden, en bood dit ontwerpprincipes voor verbeterde mRNA-LNP-formuleringen. Ten tweede werd aangetoond dat innovatieve immunisatiestrategieën, zoals heterologe prime-boost-schema's met costimulerende mRNA-LNP-boosters, de

antigeenspecifieke cellulaire immuniteit versterken. Ten derde werden de biologische interacties tussen LNP's en macrofagen diepgaand onderzocht, met behulp van geavanceerde analytische technieken in zowel celkweek- als zebrafishmodellen, om te verduidelijken hoe biodistributie, opname en intracellulaire routes barrières vormen voor efficiënte afgifte. Ten slotte maakten nieuwe beeldvormingsbenaderingen—die bioorthogonale click-chemie combineren met expansiemicroscopie—directe visualisatie van routes en lokalisatie van LNP-ioniseerbare lipiden binnen cellen mogelijk. Samen koppelen deze bevindingen het formuleringsontwerp aan immuunuitkomsten en nano-bio-interacties, en dragen zij bij aan zowel fundamenteel begrip als praktische strategieën voor volgende-generatie mRNA-LNP-therapeutica en vaccins.

Hoofdstukken 2 en 3 benadrukken samen de noodzaak om te heroverwegen hoe mRNA-LNP-vaccins worden geëvalueerd en geoptimaliseerd. De beperkte voorspellende waarde van *in-vitro*-assays onderstreept de urgentie van het ontwikkelen van experimentele kaders die de *in-vivo*-complexiteit beter weergeven, wat cruciaal zal zijn om translatie te versnellen en misleidende conclusies tijdens het testen van formuleringen te voorkomen. Tegelijkertijd wijst de beperkte immunogeniciteit van tumorantigenen op de noodzaak van vaccinatieschema's die lipidenchemie strategisch integreren met immunologische signalen. Vooruitkijkend zal vooruitgang in mRNA-kankervaccins vereisen dat verbeterde preklinische modellen worden gekoppeld aan rationeel ontworpen prime-boost-strategieën om sterkere en duurzamere antitumorimmuniteit te bewerkstelligen.

Hoofdstukken 4 en 5 tonen aan dat vooruitgang in mRNA-LNP-afgifte niet alleen afhankelijk is van formuleringsontwerp, maar ook van mechanistisch inzicht in nano-bio-interacties. De uitgesproken effecten van helperlipidenchemie op macrofaag-targeting suggereren dat het afstemmen van samenstelling een krachtige strategie kan zijn om afgifte te sturen, hoewel dit moet worden afgewogen tegen mogelijke toxiciteit bij hoge gehalten aan kationische lipiden. Bovendien vereist de hardnekkige bottleneck van endosomale ontsnapping innovatieve hulpmiddelen om het intracellulaire lot van mRNA-LNP's te onderzoeken. De hier geïntroduceerde klikbare ioniseerbare lipiden bieden een dergelijk platform, doordat zij directe visualisatie van LNP's binnen cellen mogelijk maken en nieuwe kansen openen om intracellulaire routes en -mechanismen te bestuderen, wat op zijn beurt het rationele ontwerp van de volgende generatie mRNA-LNP's kan ondersteunen. Toekomstig onderzoek zou

mechanistisch inzicht moeten integreren met ontwerp om veiligere, effectievere en weefsel specifieke mRNA-LNP's te ontwikkelen voor diverse therapeutische toepassingen.

