

Samenvatting en algemene conclusies

Het hoofdobjectief van deze thesis is gericht op het verbeteren van de selectieve afgifte van anti-kanker geneesmiddelen naar tumoren door gebruik te maken van degradeerbare nanopartikel systemen zodoende enkele van de meest voorkomende bijwerkingen van cytostatica aan te pakken. Bovendien werd ingegaan op het concept immunogene celdood, dat berust op de immunogene eigenschappen van chemotherapie. Immunotherapie, een combinatie van immunotherapie en chemotherapie, werd onderzocht met als doel de klinische toepassingen verder te verbeteren en de therapie-responsieve patiënt populatie uit te breiden.

Hoofdstuk 1.1. biedt de lezer een beknopt overzicht inzake de ontdekking en werkingsmechanisme van anti-kanker geneesmiddelen, gevolgd door een beschrijving van de therapieën tegen kanker die heden in de kliniek worden aangewend. Bovendien werd er dieper ingegaan op de anti-kanker geneesmiddelen die gebruikt werden in deze PhD thesis. Een tweede luik van dit hoofdstuk legt de nadruk op het potentieel van nanopartikel systemen om de tekortkomingen van conventionele chemotherapie aan te pakken. Vervolgens werden de voornaamste eigenschappen van nanomedicijnen, meer bepaald passieve en actieve 'targeting' toegelicht. Tenslotte werd het incorporeren van stimuli-gevoelige eigenschappen besproken, die de mogelijk bieden tot gecontroleerde afgifte en polymeer degradeerbaarheid. Betreffende de stimuli-responsieve triggers, worden transiënt thermo-responsieve en pH-responsieve polymeren beschreven en de verscheidenheid en specificiteit van getriggerde nanopartikel platform benadrukt.

In **Hoofdstuk 1.2** wordt de complexe relatie tussen tumoren enerzijds en de cellen van het immuunsysteem toegelicht, wat heeft geleid tot de ontwikkeling van verscheidene immunotherapieën. Vervolgens werden de mogelijke voordelen omtrent het combineren van immunotherapie met chemotherapie uitvoerig besproken. In het bijzonder werd het concept van immunogene celdood (ICD) geschetst, dat berust op de onderliggende immuun stimulerende eigenschappen van enkele anti-kanker geneesmiddelen. Een beknopt overzicht wordt geboden van de belangrijkste en tot op heden gekende 'damage-associated molecular patterns' (DAMPs), samen hun kenmerkende eigenschappen. Tevens komt de onderliggende

signaal transductie cascade voor de blootstelling van calreticuline (CRT) uitvoerig aan bod, dat het resultaat is van ER stress. Tenslotte wordt een overzicht en classificatie van de huidige gekende ICD induceerders weergegeven samen met de huidige toegepaste *in vivo* screening procedures.

In **Hoofdstuk 2** wordt een eenvoudige route voor de hydrofobe modificatie en opzuivering van een HPMA derivaat voorgesteld, die aanleiding geeft tot degradeerbare temperatuur-responsieve polymeren en waarbij de gevormde degradatieproducten een minimale toxiciteit vertonen. Na modificatie van de vrije OH groep van HPMA met een ethyl-zijketen via een hydrolyse-gevoelige carbonaat ester, werd aangetoond dat dit monomeer kan gepolymeriseerd worden via vrije radicalaire polymerisatie, gebruikmakend van een PEG-macroinitiator strategie. De gesynthetiseerde blok copolymeren vormden micellaire nanopartikels in waterig midden met een diameter van ongeveer 40 nm en vertoonden een 'cloud point' temperatuur van 17 °C (T_{cp}), wat binnen een relevant bereik ligt voor farmaceutische doeleinden. Met name zal eenvoudigweg opwarmen boven de fase-transitie temperatuur aanleiding geven tot het spontaan ordenen en vormen van hydrofobe domeinen, die kunnen aangewend worden om hydrofobe geneesmiddelen op te lossen, wat in dit werk ook geïllustreerd is voor paclitaxel (PTX). De gevormde micellaire formulatie werd gekenmerkt door een hoge colloïdale stabiliteit met een lage kritische micellaire concentratie (CMC). Onder versnelde basische condities, vielen de nanopartikels uiteen in oplosbare unimeren, wat gestaafd werd door middel van dynamische lichtverstrooiing (DLS). Tevens werd via flow cytometrie (FACS) en confocale microscopie aangetoond dat de ontwikkelde nanopartikels in staat zijn om geëncapsuleerde hydrofobe componenten af te geven aan 2D en 3D kankercel culturen. Tenslotte, hebben we aangetoond dat deze blok copolymeren het hydrofobe anti-kanker geneesmiddel PTX kunnen formuleren en cytotoxiciteit *in vitro* kunnen induceren in dezelfde mate als de commercieel geavanceerde PTX formulatie Genexol-PM, terwijl onbeladen block copolymeren geen intrinsieke cytotoxiciteit vertonen.

In **Hoofdstuk 3**, hebben we het bovenvermelde werk verder uitgebreid op verschillende niveaus. Op monomeer niveau, hebben we een alternatieve strategie ontwikkeld voor de synthese van carbonaat-gemodificeerde hydroxyl-bevattende monomeren, wat ons toeliet om deze benadering toe te passen op acrylamides, die hiervoor onbereikbaar waren door het

optreden van Michael additie als zijreactie. Tevens hebben we naast een ethyl zijketen de introductie van een benzyl zijketen bestudeerd met als doel de micellaire stabiliteit en geneesmiddelbelading te verhogen door π - π “stacking” van de aromatische groepen in de micelkern. Op het niveau van de polymerisatie route, hebben we in dit hoofdstuk een gecontroleerde radicalaire polymerisatie techniek aangewend, met name, ‘reversible addition-fragmentation chain transfer’ (RAFT) polymerisatie om polymeren te verkrijgen met gecontroleerd molecuulgewicht, lage dispersiteit en behoud van functionele eindgroepen. In dit werk werd efficiënte RAFT polymerisatie verkregen van de gesynthetiseerde monomeren en werd een bibliotheek aan goed-gedefinieerde block copolymeren met verschillende ‘degrees of polymerization’ (DP) gesynthetiseerd. Om de veelzijdigheid van onze aanpak verder uit te breiden wat betreft polymeersynthese, spontaan micellair gedrag, oplosbaarheid van geneesmiddelen en *in vitro* cellulaire interacties, werden polyethyleenglycol (PEG) en polyHEAm als hydrofiele polymeren vergeleken. De blok copolymeren vormen micellaire nanopartikels (10-100 nm) in PBS en zijn in staat om efficiënt hydrofobe kleurstoffen en anti-kankergeneesmiddelen te formuleren. Een benzylcarbonaat ester zijketen verhoogt de micellaire stabiliteit en geneesmiddelbelading. Tevens werd aangetoond dat PEG als hydrofiel blok in vergelijking met HEAm veelbelovendere resultaten vertoont, wat betreft colloïdale stabiliteit en geneesmiddelbeladingsgraad. Confocale microscopie toonde aan dat de micellen een hydrofobe kleurstof efficiënt kunnen afgeven in kankercellen. Tenslotte werd ook aangetoond dat efficiënte formulatie van het anti-kanker geneesmiddel paclitaxel aanleiding geeft tot een gelijkaardig of zelfs betere *in vitro* cytotoxiciteit in vergelijking met Abraxane en Genexol-PM bij gelijke geneesmiddeldosis. Bijkomende aanpassingen in design van deze dragersystemen kunnen overwogen worden in de richting van crosslinken van nanopartikels en covalent koppelen van een geneesmiddel aan het dragersysteem om zo partikelintegriteit in de bloedbaan te kunnen verzekeren.

In **Hoofdstuk 4**, zijn we dieper ingegaan op het concept van actieve ‘targeting’ om zo meer selectieve afgifte van geneesmiddel-beladen polymeer-gebaseerde nanomedicijnen te bekomen naar weefsels die een specifieke receptor/antigen tot overexpressie brengen. In dit werk hebben we het gebruik van het ACUPA ligand bestudeerd dat een hoge bindingsaffiniteit heeft voor prostaat specifiek membraan antigen (PSMA), een receptor die tot overexpressie wordt gebracht door maligne prostaat kankercellen en de endotheelcellen van

neovasculatuur in solide tumoren. In een eerste stap werd een fluorescent gelabeld ACUPA conjugaat gesynthetiseerd, dat *in vitro* zeer efficiënt interageerde met de PSMA-positieve prostaat kankercellen, LNCaP cellen, in tegenstelling tot de PSMA-negatieve prostaat kanker cellen, PC-3 cellen. Dit werd gestaafd door confocale microscopie en FACS. Tevens werd ligand binding met PSMA-positieve cellen opgeheven na co-incubatie met een overmaat van het concurrerend ligand 2-(phosphonomethyl)-pentandioic acid (2-PMPA). Aangemoedigd door deze bevindingen, hebben we ons toegelegd op het ontwikkelen van een reeks van nanomedicijnen, waaronder (1) nanopartikels met verschillende ACUPA eenheden gekoppeld aan de beschikbare ketenuiteinde (2) gePEGyleerde lipide nanopartikels met ACUPA eenheden aan de PEG ketenuiteinde en (3) hydrofiele polymeren met meerdere ACUPA eenheden langs de polymeer ruggengraat. Alles in acht genomen, kunnen we concluderen dat hoewel het gebruik van laag molecuulair gewicht-bevattende ACUPA moleculen erg efficiënt is in het 'targeten' van cellen die PSMA tot expressie brengen, macro- en supramoleculaire structuren echter een veel lagere specificiteit en beduidend meer niet-specifieke cellulaire opname vertonen. Dit kan mogelijk leiden tot misinterpretaties en daarom stellen wij voor dat uiterste voorzichtigheid in acht moet genomen worden wanneer er overwogen wordt ACUPA te gebruiken als 'targeting' ligand en dat bovenal geschikte controles geïncubeerd moeten worden in de respectievelijke studies.

Hoofdstuk 5 beschrijft de combinatie van de ICD induceerder oxaliplatin met het imidazoquinoline-derivaat en toll-like receptor (TLR) 7/8 agonist 1-(4-(aminomethyl)benzyl)-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinoline-4-amine (IMDQ). Een potentiële, veelbelovende strategie om oxaliplatin met IMDQ te combineren is door gebruik te maken van de Pt (IV) prodrug strategie. Immers, de introductie van axiale liganden laat toe om de biologische eigenschappen aan te passen door deze te modificeren met biologisch, actieve liganden, met de vorming van multifunctionele complexen tot gevolg. IMDQ werd gekoppeld aan 1 axiale ligand door middel van een succinate linker. Het overige axiale ligand werd vervolgens gemodificeerd met een hydrofobe octadecyl (C₁₈) lipide keten om cytotoxiciteit te verhogen d.m.v. de toegenomen cellulaire opname. De gesynthetiseerde component, IMDQ-Pt-C₁₈, werd volledig gekarakteriseerd d.m.v. ESI-MS en NMR spectroscopie. Via CyTOF massa cytometrie werd een toegenomen cellulaire opname voor Pt (IV) lipide conjugaten aangetoond in vergelijking met niet geformuleerde oxaliplatin. *In vitro* celdood en aangeboren

immuun activatie assays hebben ook geïllustreerd dat IMDQ-Pt-C₁₈ hogere activiteit vertoont na cellulaire opname. Tenslotte, hebben we *in vivo* aangetoond dat het IMDQ-Pt-lipide prodrug in staat is om regio selectieve immuunactivatie te vertonen op de plaats van injectie zonder systemische inflammatie te veroorzaken. Deze initiële *in vitro* en *in vivo* resultaten zijn bemoedigend om verder het therapeutisch potentieel van IMDQ-Pt-C₁₈ te onderzoeken *in vivo*. Tevens, kan de reductie snelheid van IMDQ-Pt-C₁₈ nagegaan worden om zo bijkomend inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van dit conjugaat. Bijkomend onderzoek moet ook besteed worden aan het vinden van een optimale farmaceutische formulatie om de beperkte wateroplosbaarheid van dit component te verbeteren.

Hoofdstuk 6 plaatst dit werk in een bredere internationale context. In een eerste luik komen enkele van de voornaamste goedgekeurde nanomedicijnen in de kliniek uitvoerig aan bod, samen met de mogelijkheden en relevante uitdagingen, waar succesvolle ontwikkeling van nanomedicijnen het hoofd aan moet bieden. De complexiteit inzake tumor 'targeted' afgifte van geneesmiddelen omvat (1) de heterogeniteit van het EPR effect (2) de verschillende barrières die actieve 'targeting' bemoeilijken en (3) stabiliteit van nanomedicijnen in de bloedbaan. Bovendien worden een aantal belangrijke overwegingen en suggesties voor toekomstig onderzoek beschreven met als doel de klinische translatie en therapeutisch resultaat te verbeteren. Deze bestaan uit (1) geschikte preselectie van patiënten, de zogenaamde gepersonaliseerde geneeskunde (2) implementatie van niet-invasieve 'companion diagnostics' (3) meer geavanceerde en realistische muismodellen en (4) focus op combinatietherapie. In een tweede luik wordt het potentieel van immunogene celdood (ICD) in kankertherapie toegelicht. Ondanks dat immunotherapieën vaak indrukwekkende klinische responsen te weeg brengen, zijn ze vaak enkel beperkt tot een aantal patiënten en aantal types kanker. De implementatie van immunochemotherapie kan veelbelovend zijn door additionele of synergistische effecten te bekomen met een sterke, duurzame therapeutische respons tot gevolg. Bijgevolg werden combinatie therapieën bestaande uit een ICD-induceerder en enkele immunotherapieën (adoptieve cel transfer (ACT), immuun-checkpoint inhibitoren (ICBs), toll-like receptor (TLR) agonisten en vaccins) geïllustreerd. Tenslotte werden de toekomstperspectieven en uitdagingen betreffende ICD therapieën, waaronder (1) de identificatie van de optimale dosis en medicatieschema voor ICD induceerders (2)

identificatie van geschikte biomerkers, (3) meer betrouwbare *in vitro* biochemische assays en (4) meer realistische *in vivo* tumor modellen, uiteengezet.