

Dit proefschrift onderzoekt verschillende strategieën voor het ontwerpen van multivalente antilichaam-wervende moleculen (ARMs) voor toepassing in kankerimmunotherapie.

**Hoofdstuk 1** introduceert de functionele mechanismen en samenstelling van Antilichaam Rekruterende Moleculen (ARMs). ARMs zijn bifunctionele moleculen die bestaan uit een antilichaam-bindend domein (ABD), meestal een hapteen voor het aantrekken van endogene anti-hapteen antilichamen, en een target-bindend domein (TBD), dat een targetligand is voor binding aan het oppervlak van tumorcellen. ARMs mediëren de vorming van een ternair complex tussen endogene antilichamen en kankercellen, waardoor kankercellen worden gemarkeerd voor vernietiging via het aangeboren immuunsysteem, waaronder antilichaam-afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit (ADCC), antilichaam-afhankelijke fagocytose (ADCP) en complement-afhankelijke cytotoxiciteit (CDC).

In de afgelopen decennia werd er aanzienlijke vooruitgang geboekt op dit gebied. In **Hoofdstuk 1** werden verschillende aspecten van de ontwikkeling van ARMs besproken, inclusief het gebruik van rhamnose, DNP,  $\alpha$ -Gal en FITC-derivaten als ABDs, evenals het gebruik van lipideketens, FA, uPAR, OPN en PSMA als TBDs. Meerdere studies hebben aangetoond dat ARMs succesvol antilichamen kunnen aantrekken en immuungemedieerde doding van kankercellen zowel *in vivo* als *in vitro* kunnen bewerkstelligen. Verder hebben verschillende studies aangetoond dat multivalente ARMs voordelen bieden ten opzichte van monovalente ARMs door de aviditeit van het gevormde ternaire complex te verhogen. Sommige ARMs wordt reeds klinisch getest en er is een vooruitzicht dat meer veelbelovende ARMs ook klinische zullen getest worden in de toekomst.

In **Hoofdstuk 2** richtten we ons op de synthese en karakterisering van antilichaam-recruterende oligomeren geproduceerd door vaste fase synthese. Vaste fase synthese is interessant omwille van het vereenvoudigde opzuiveringsproces en de hoge efficiëntie, wat de parallelle productie van een groot aantal analoge verbindingen vergemakkelijkt. Het oligomere ARM-syntheseprocess begon met een 2-chlorotriyl chloride polystyreenhars en omvatte conjugatie van ABD en TBD motieven via  $S_N2$ -reacties, gevolgd door acylering met bromoazijnzuur. In dit werk werden alkyl lipiden bestaande uit 14 koolstofatomen gebruikt als TBD. Alkyl lipiden kunnen cellen binden door middel van hydrofobe interactie met de fosfolipiden dubbellaag van het

plasmamembraan. DNP werd gebruikt als ABD, en de lengte van de PEG-spacer tussen het DNP-motief en de oligomeerketen werd geëvalueerd voor zijn invloed op de efficiëntie van antilichaam-rekrutering *in vitro*.

Drie series oligomeren werden gesynthetiseerd, elk met variërende aantallen en positionering van ABDs en TBDs. Uit de eerste serie oligomeren werd een oligomeer met twee ABD-motieven met een PEG<sub>2</sub>-spacer en twee TBD-motieven geïdentificeerd als de meest potente in antilichaam-rekrutering. Op basis van deze structuur werden zes analoge oligomeren geproduceerd, waarbij het aantal eenheden in de oligomeerketen werd uitgebreid. *In vitro* screening van deze oligomeren wees op oplosbaarheidsproblemen, waarschijnlijk als gevolg van de toegenomen hydrofobiciteit van deze structuren. Daarom werd een derde serie oligomeren geproduceerd, waarbij de PEG<sub>2</sub>-spacer werd vervangen door een PEG<sub>8</sub>-spacer. De resulterende oligomeren vertoonden een sterk verbeterde oplosbaarheid, en we identificeerden een oligomeer met één enkel ABD-motief en twee TBD-motieven als de meest potente antilichaam-rekruteerder van alle gesynthetiseerde oligomeren.

Vervolgens werd dit oligomeer verder geconjugeerd met Rhodamine als fluorescente kleurstof en een imidazoquinoline (IMDQ) TLR7/8 agonist om activatie van het aangeboren immuunsysteem te induceren. De cellulaire interactie van dit oligomeer werd onderzocht met behulp van flowcytometrie en confocale microscopie, waarbij effectieve celbinding en rekrutering van anti-DNP antilichamen aan het celoppervlak werd bevestigd. De activiteit van het IMDQ-geconjugeerde oligomeer werd getest op RAW Blue-cellen, waarbij succesvolle activering van TLR-signalisatie *in vitro* werd aangetoond. *In vivo*, in CT26 tumor-dragende IFN- $\beta$ ( $+/Δ\beta$ )-luc reporter muizen, toonde intratumorale injectie van het trifunctionele oligomeer aangeboren immuunactivatie in de tumor micro-omgeving, met gelijktijdige lokalisatie van het Rhodamine-gelabelde oligomeer binnen de tumor. Daarnaast bevestigde flowcytometrieanalyse van cel suspensies van gedissecteerde tumoren de binding van het oligomeer aan de tumorcellen en de capaciteit van het oligomeer om anti-DNP antilichamen naar cellen in oligomeer-geïnjecteerde tumoren te rekruteren.

In **Hoofdstuk 3** werden ARMs ontwikkeld gericht op *carbonic anhydrase IX* (CAIX), een celoppervlakte-eiwit dat over-uitgedrukt wordt in hypoxische solide tumoren. Hiervoor selecteerden we een acetazolamide-analoog als TBD, vanwege de hoge affiniteit voor CAIX. DNP werd gebruikt als ABD. Aanvankelijk werden monovalente

ARMs, specifiek AAZ-PEG<sub>2</sub>-DNP en AAZ-PEG<sub>8</sub>-DNP met verschillende lengtes van PEG-eenheden als linkers, gesynthetiseerd en respectievelijk SL-ARM-1 en SL-ARM-2 genoemd. Bij het vergelijken van de antilichaam-rekruterende capaciteiten van deze SL-ARMs op SK-RC-52 cellen, die CAIX over-uitdrukken op hun oppervlak, vonden we dat SL-ARM-2, met een langere PEG-linker, beter presteerde dan SL-ARM-1. Daarentegen toonden N<sub>3</sub>-PEG<sub>2</sub>-DNP en N<sub>3</sub>-PEG<sub>8</sub>-DNP, die geen AAZ bevatten, geen vermogen om anti-DNP antilichamen te rekruteren, wat bevestigt dat de succesvolle binding aan het tumorceloppervlak werd gemedieerd door AAZ.

Om de potentiële voordelen van multivalentie te onderzoeken, werden dexraan-ketens met een molecuulgewicht van 150 kDa geconjugeerd met meerdere AAZ-PEG<sub>8</sub>-N<sub>3</sub> en DNP-PEG<sub>8</sub>-N<sub>3</sub> via CuAAC-clickchemie, met een AAZ/DNP-verhouding van 1:1. De vergelijking tussen SL-ARM-2 en dex-ARMs toonde de superieure antilichaam-rekruterende capaciteit van multivalente ARMs ten opzichte van monovalente ARMs. In competitie-experimenten werd aangetoond dat vrije AAZ de binding van ARMs aan het tumorceloppervlak op een concentratie-afhankelijke manier inhibeerde, wat de specifieke binding van AAZ aan CAIX benadrukte. Verschillende verhoudingen van AAZ en DNP (1:1, 3:1 en 1:3) werden geconjugeerd aan dexraan, waarbij een concentratie-afhankelijke effect werd aangetoond. De verschillen in ligand-verhouding hadden echter een minimale impact, wat de robuustheid van het dex-ARMs systeem aantoont. Daarnaast werden muizen geïmmuniseerd met KLH-DNP met LNP (poly(I:C)) als adjuvant, en hun serum werd verzameld. De aanwezigheid van anti-DNP antilichamen in het serum werd bevestigd via ELISA. Zowel SL-ARM-2 als dex-ARMs konden met succes IgG1 antilichamen uit het serum rekruteren naar SK-RC-52 cellen. De duidelijke performantie van beide ARMs in het binden van IgG1 benadrukten het voordeel van multivalentie, wat consistent is met het onderzoek beschreven in deze studie en het gepubliceerde werk besproken in **Hoofdstuk 1**.

In **Hoofdstuk 4** werden pH-gevoelige polymeren- en blokpolymeren-gebaseerde ARMs gesynthetiseerd om de zure pH van solide tumoren, die het gevolg is van hoge metabole tarieven en melkzuurproductie door tumorcellen, te benutten als een trigger om endogene antilichamen naar het oppervlak van tumorcellen te rekruteren. De polymeren werden gesynthetiseerd door RAFT-polymerisatie van pentafluorfenylmethacrylaat (PFPMMA). Deze polymeren werden vervolgens

gefunctionaliseerd met DNP-motieven als ABDs, en alkyl-lipideketens en ioniseerbare azepanylmotieven als TBDs. De antilichaam-rekruterende capaciteit van deze polymeren werd getest bij zowel neutrale als zure pH. De aanwezigheid van azepanylmotieven verhoogde de sensitiviteit van deze polymeren om antilichamen te rekruteren bij zure pH.

Om de pH-gevoelige eigenschappen van de azepanylmotieven verder te benutten, werd een amfifiel blokcopolymeer gesynthetiseerd, bestaande uit methoxytriethyleenglycol methacrylaat (MEO3MA) als een hydrofiele blok en PFPMA als een *scaffold* voor de daaropvolgende conjugatie van DNP- en azepanylmotieven. Het resulterende blokcopolymeer vormde micellen in een waterige buffer bij neutrale pH, terwijl bij een zure pH van 5,5 de micellen uiteenvielen in oplosbare polymeerketens. De zeta-potentiaal van de micellen nam duidelijk af van pH 5 tot 9, wat hun pH-afhankelijke gedrag bevestigt. Als controle vertoonde een blokpolymeer, met azepanylmotieven (zonder DNP), vergelijkbare eigenschappen. De capaciteit van deze blokpolymeren te binden aan het celoppervlak en vervolgens anti-DNP antilichamen te rekruteren werd onderzocht op de CT26 tumorcellijn. De resultaten toonden een sterkere binding van de micellen en sterkere rekrutering van antilichamen in zuur milieu, in vergelijking met neutraal milieu.

In **Hoofdstuk 5** werd de bredere internationale context van dit proefschrift beschreven, waarbij de huidige stand van zaken en uitdagingen voor kankertherapie werden belicht. Immunotherapie speelt een cruciale rol bij de behandeling van kanker, met talrijke commercieel beschikbare medicijnen en strategieën zoals monoklonale antilichamen (mAbs) en chimerische antigeenreceptor T (CAR-T) cellen. In plaats van de activiteit van specifieke celoppervlakte-eiwitten te blokkeren of apoptose te induceren, streven verschillende mAbs er ook naar de aangeboren immuunrespons te activeren, inclusief ADCC, ADCP en CDC. Evenzo faciliteren ARMs het doden van tumorcellen door middel van aangeboren immuunresponsen gebaseerd op endogene antilichamen, wat een lage toxiciteit biedt vergeleken met mAbs en hen mogelijk een goed alternatief maakt.

ARMs zijn onderdeel van een bredere categorie bifunctionele moleculen die zijn ontwikkeld voor immunotherapie. In de afgelopen jaren zijn verschillende bifunctionele moleculen ontwikkeld voor immunotherapie. Opmerkelijk zijn chimere moleculen voor gerichte eiwitdegradatie (TPD), waaronder proteolyse-gerichte chimere

(PROTACs), autofagie-gerichte chimere (AUTACs), autofagosoom-koppelende verbindingen (ATTECs), lysosoom-gerichte chimere (LYTACs) en antilichaam-gebaseerde PROTACs (AbTACs), die zijn ontworpen om specifieke eiwitten (POIs) te degraderen. Door het richten en degraderen van tumor-gerelateerde POIs bieden deze chimere een nieuwe benadering voor het afdoden van tumorcellen. Bovendien hebben antilichaam-geneesmiddel conjugaten (ADCs), die direct cytotoxiciteit in tumorcellen induceren, veelbelovende werkzaamheid getoond in de kankerbehandeling. Verschillende ADCs zijn al goedgekeurd voor klinisch gebruik. De voortdurende ontwikkeling van bifunctionele moleculen en hun opname in de klinische praktijk benadrukken het dynamische en zich ontwikkelende landschap van kankerimmunotherapie, met als doel de therapeutische uitkomst te verbeteren en bijwerkingen te verminderen.