

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Adoptieve celtherapieën hebben grote vooruitgang geboekt op het gebied van kankerimmunotherapieën. Sinds de goedkeuring van de eerste adoptieve celtherapie, Provenge, in 2010, zijn er acht andere producten goedgekeurd door de Food and Drug Administration (FDA). Opmerkelijk is dat op één product na al deze goedgekeurde therapieën afhankelijk zijn van de manipulatie van autologe T-cellen. Hun *ex vivo* manipulatie stelt T-cellen in staat om specifieke tumor-geassocieerde antigenen te herkennen en opmerkelijke therapeutische resultaten te behalen. Het gebruik van autologe T-cellen brengt echter specifieke uitdagingen met zich mee als ook de productie van de therapieën gaat gepaard met ernstige bijwerkingen. Als alternatief worden NK-cellen onderzocht voor adoptieve celtherapieën.

NK-cellen bieden een specifiek aantal voordelen ten opzichte van T-cellen, waaronder een lager risico op ernstige bijwerkingen (zoals CRS en neurotoxiciteit) en de mogelijkheid om *off-the-shelf* producten te genereren. Hoewel NK-cellen ook het voordeel bieden van intrinsieke cytotoxiciteit, is de manipulatie van NK-cellen nog steeds gewenst om hun algehele antitumorreacties te verbeteren en een langduriger persistentie *in vivo* te bereiken. In **Hoofdstuk 1** bespreken we de verschillende methoden die onderzocht worden om de efficiëntie van NK-cellen te verbeteren. De momenteel goedgekeurde T-celtherapieën maken gebruik van virale transductie, wat gepaard gaat met verschillende nadelen, zoals veiligheidsrisico's, beperkte cargo-capaciteit, regelgevingskwesaties en hoge productiekosten. Bovendien behaalt virale transductie van NK-cellen niet dezelfde hoge efficiëntie als bij T-cellen. Dit wordt toegeschreven aan de afhankelijkheid van NK-cellen van patroonherkenningssignalen voor de identificatie van abnormale cellen, wat hun gevoeligheid voor transductie verhoogt. Als resultaat vatten we in **Hoofdstuk 1** de verschillende niet-virale transfectietechnologieën samen die worden geëvalueerd voor efficiënte manipulatie van NK-cellen. We richten ons niet alleen op de werkingsmechanismen en prestaties van de technieken, maar ook op het vermogen om een hoge celviabiliteit en optimale celfunctionaliteit te behouden.

Een specifieke niet-virale transfectietechnologie die de afgelopen jaren veel aandacht heeft gekregen, is nanopartikel-gemedieerde fotoporatie. Deze techniek maakt gebruik van de combinatie van fothermische nanodeeltjes en hun bestraling met gepulseerd laserlicht om een tijdelijke permeabilisatie van het plasmamembraan te induceren, waardoor externe moleculen de cel kunnen binnendringen. In **Hoofdstuk 1** bespreken we de overgang van nanopartikel-gemedieerde fotoporatie met goudnanodeeltjes (AuNP's) naar biocompatibele en biologisch afbreekbare

polydopaminenanodeeltjes (PDNPs), om de klinische toepasbaarheid van de techniek te verbeteren en de mogelijke nadelige effecten van gefragmenteerde AuNPs na laserbestraling te vermijden. In dit proefschrift hebben we het potentieel van nanopartikel-gemedieerde fotoporatie met PDNPs beoordeeld voor de ontwikkeling van NK-celtherapieën.

In **Hoofdstuk 2** leverden we een eerste *proof-of-concept* voor de aflevering van macromoleculen (zoals FD500 en eGFP mRNA) in NK-92MI-cellen. PDNP's van 250 nm en 500 nm werden gebruikt en na optimalisatie van verschillende fotoporatieparameters (zoals nanopartikelconcentratie en laserfluence) toonden we aan dat de cellen efficiënt werden getransfecteerd terwijl de celviabiliteit hoog bleef. Bovendien vergeleken we deze resultaten met *state-of-the-art* elektroporatie. Dit bood ons een relevante vergelijking, aangezien elektroporatie momenteel de meest gebruikte niet-virale transfectietechnologie is voor de manipulatie van NK-cellen. Hieruit bleek dat fotoporatie elektroporatie kon overtreffen wat betreft *transfection yield*, dankzij de zachtere behandeling van de cellen. Elektroporatie zorgde echter voor een hogere expressie per cel binnen de levende populatie. De significante verschillen in celviabiliteit na fotoporatie en elektroporatie moedigden ons aan om de kwaliteit van de cellen na de behandelingen verder te onderzoeken. We vonden geen verschillen in het proliferatievermogen van de cellen en hun expressie van verschillende oppervlakte-eiwitten. We observeerden echter veranderingen in de afgifte van cytokinen door de cellen na elektroporatie, wat niet werd waargenomen bij de gefotoporeerde cellen. Ten slotte toonden we aan dat het *killing potential* van gefotoporeerde NK-92MI-cellen niet verschilde van niet-behandelde cellen. Al met al tonen deze resultaten aan dat PDNP-gemedieerde fotoporatie een efficiënte en zachte transfectie van NK-92MI-cellen mogelijk maakt, terwijl het fenotype van de cellen behouden blijft.

De manipulatie van NK-92(MI)-cellen is relevant omdat ze momenteel worden geëvalueerd in verschillende klinische onderzoeken voor kankerimmunotherapie. Echter, aangezien het een geïmmortaliseerde cellijn betreft, vereisen NK-92(MI)-cellen γ -bestraling voorafgaand aan toediening aan patiënten, om ongecontroleerde proliferatie *in vivo* te voorkomen. Primaire menselijke NK-cellen daarentegen vereisen geen γ -bestraling, waardoor een langere persistentie van de cellen *in vivo* mogelijk is. Bovendien zijn primaire menselijke NK-cellen meer heterogeen en geven ze een betere representatie van patiënt-bekomen NK-cellen. Om deze redenen hebben primaire menselijke NK-cellen vaak de voorkeur boven NK-92MI-cellen voor therapeutische toepassingen. Dit bracht ons ertoe om in **Hoofdstuk 3** de manipulatie van de cellen met PDNP-gemedieerde fotoporatie te onderzoeken. Net als in **Hoofdstuk 2** optimaliseerden we de verschillende fotoporatieparameters (zoals

deeltjesgrootte, deeltjesconcentratie en sterkte van de laser) en vergeleken we de verkregen resultaten met elektroporatie. Fotoporatie toonde een efficiënte transfectie van de cellen aan, terwijl de celviabiliteit behouden bleef, wat leidde tot een 3 keer hogere *transfection yield* in vergelijking met elektroporatie. Transfectie van de NK-cellen door middel van elektroporatie daarentegen zorgde voor een hogere expressie per cel, maar ging gepaard met hoge celtoxiciteit. Vervolgens onderzochten we of fotoporatie met behulp van PDNPs gebruikt kon worden om Cas9 ribonucleoproteïnen (RNPs) af te leveren in NK-cellen. De Cas9-RNPs richtten zich op de remmende NKG2A-receptor, omdat dit een veelgebruikte strategie is om de toxiciteit van NK-cellen te vergroten (zie **Hoofdstuk 1**). In dit hoofdstuk demonstreerden we de succesvolle knock-out van de receptor met fotoporatie, wat betere resultaten opleverde dan elektroporatie wat betreft knock-out opbrengst. Vanwege de significante verschillen in celviabiliteit tussen elektroporatie en fotoporatie besloten we, zeer vergelijkbaar met onze aanpak in **Hoofdstuk 2**, de conditie van de cellen na de toepassing van deze technologieën te onderzoeken. Noch fotoporatie, noch elektroporatie hadden enige significante invloed op het fenotype van de cellen, hun proliferatiecapaciteit of hun cytolytische activiteit. Op basis van deze resultaten konden we concluderen dat fotoporatie dient als een zachte transfectietechnologie voor de manipulatie van primaire menselijke NK-cellen.

Nanopartikel-gevoelige fotoporatie heeft met succes de aflevering van verschillende macromoleculen in verschillende celtypen aangetoond, waaronder NK-cellen, zoals hierboven besproken. Echter, de techniek vereist verdere optimalisatie om grote constructen zoals grote mRNA-strengen en pDNA af te leveren. Deze beperking werd recentelijk aangepakt in het werk van Fraire *et al.*, waar ze zelf-assemblerende nanostructuren, 'nanobombs' (NBs) genoemd, synthetiseerden. Deze NBs bestonden uit een fothermische ijzeroxidekern (IONP) waaraan kleinere entiteiten of 'nanoprojectielen' waren bevestigd. Net als voorheen zou de IONP nanobubbels (VNBs) genereren bij bestraling met gepulseerd laserlicht. In dit geval zouden de nanoprojectielen echter worden voortgestuwd in het omliggende medium en plasmamembraan van naburige cellen, waardoor de aflevering van pDNA mogelijk werd. In **Hoofdstuk 4** probeerden we NBs te synthetiseren voor de transfectie van NK-cellen met mRNA en vooral pDNA. Helaas waren de IONPs die eerder door Fraire *et al.* werden gebruikt, niet langer verkrijgbaar, wat ons ertoe bracht om nieuwe IONPs en nieuwe strategieën te evalueren om de nanoprojectielen te bevestigen. In totaal synthetiseerden we zes verschillende NBs, waarbij we vier verschillende IONPs en twee verschillende koppelingsstrategieën gebruikten en hun morfologie evalueerden. Aangezien de tijd beperkt was, konden we slechts één NB evalueren voor intracellulaire aflevering van FD500 in HeLa-cellen, wat helaas niet succesvol was. Indien mogelijk zou dit werk moeten worden voortgezet door ook de andere NBs te evalueren voor

de aflevering van macromoleculen in cellen. Bovendien zouden systematischere experimenten moeten worden uitgevoerd, zoals een meer diepgaande analyse van de hechting van de nanoprojectielen aan de kern, hun vrijgave na laserbestraling en evaluatie van hun aanwezigheid in cellen.

In **Hoofdstuk 5** bieden we de bredere internationale context, relevantie en toekomstperspectieven van dit werk. We beginnen met het beschrijven van de evolutie van adoptieve celtherapieën over de afgelopen jaren en bieden een overzicht van de therapieën die momenteel goedgekeurd zijn. Ondanks hun grote succes worden deze therapieën beperkt door hun gebruik van autologe cellen en het risico op ernstige bijwerkingen (zoals eerder besproken). We leggen uit hoe dit het veld heeft gedreven om verschillende celtypen, zoals NK-cellen, te verkennen voor de ontwikkeling van innovatieve celtherapieën. Bovendien hebben de huidige goedgekeurde therapieën te maken met uitdagingen zoals langdurige en dure productieprocessen, wat resulteert in verlengde '*vein-to-vein times*'. We bespreken hoe dit de interesse in niet-virale transfectietechnologieën (zoals elektroporatie, microfluidische apparaten) heeft vergroot, die oplossingen bieden voor deze uitdagingen. Daarnaast benadrukken we het potentieel van nanopartikel-gemedieerde fotoporatie door de veelbelovende resultaten in dit proefschrift te beoordelen. Ten slotte onderzoeken we de voordelen van gedecentraliseerde en geautomatiseerde productiesystemen om sneller en betaalbaardere therapieën te leveren, als ook de mogelijkheid van NK-cellen om *off-the-shelf* celtherapieën te bieden.