



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Challenges and opportunities in nasal subunit vaccine delivery : mechanistic studies using ovalbumin as a model antigen**

Slütter, B.A.

### **Citation**

Slütter, B. A. (2011, January 27). *Challenges and opportunities in nasal subunit vaccine delivery : mechanistic studies using ovalbumin as a model antigen*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16394>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16394>

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

---

# Appendix

**Nederlandse Samenvatting**

**List of abbreviations**

**List of publications**

**Curriculum vitae**

**Nawoord**



## Nederlandse Samenvatting

Vaccinatie via de neus, verder te noemen nasale vaccinatie, is een veelbelovend alternatief voor de normale injecteerbare vaccines. De neusholte is heel toegankelijk, waardoor eenvoudige toediening van een vaccin, bijvoorbeeld als neusspray of neusdruppels, mogelijk is. Het neusepithelium is bovendien uitgerust met een groot aantal immuuncellen, waardoor het in staat is een beschermende immuunreactie te bewerkstelligen. Ook de enzymatische activiteit er relatief laag (in vergelijking met bijvoorbeeld de darmen) waardoor een vaccin in de neus minder snel afgebroken wordt.

Er is inmiddels al een nasaal vaccin op de markt (griepvaccin, Flumist®), wat aantoont dat nasale vaccinatie zeker mogelijk is. Een nadeel van dit vaccin is echter dat het berust op een verzwakt griepvirus. Dit is weliswaar geen probleem voor gezonde mensen, maar bij ouderen, baby's en mensen met een verzwakte afweer kan dit vaccin vervelende bijwerkingen hebben. Tot dusver is het nog niet gelukt om een veilig en effectief nasaal vaccin te ontwikkelen dat slechts uit een deel (een antigeen) van een virus bestaat (subunit vaccin). In tegenstelling tot Flumist® zou zo'n subunit vaccin ook geschikt kunnen zijn voor jonge kinderen en ouderen (**Hoofdstuk 1**). Dit proefschrift stelt zich dan ook ten doel de mogelijkheid van nasale vaccinatie met subunit antigenen te onderzoeken.

De vaccinformulering kan de sleutel zijn tot succesvolle nasale vaccinatie. Het antigeen moet met de nodige hulpstoffen worden voorzien om de uitdagingen die de neusholte biedt aan te kunnen gaan. Voor het ontwerpen van nasale vaccinformuleringen, zullen we eerst moeten weten welke hindernissen het antigeen zal tegenkomen vanaf het moment van toedienen tot aan het bereiken van een beschermende immuunsrespons. Daarom zijn in dit proefschrift drie doelstellingen beschreven:

1. Het identificeren van de belangrijkste barrières die subunit antigenen moeten overwinnen om een immuunreactie op te wekken na nasale toediening.
2. Het ontwikkelen van methoden die het mogelijk maken deze hindernissen te onderzoeken.
3. Het gebruiken van de verkregen kennis om nasale vaccinformuleringen te ontwerpen en te testen.

Het eerste doel komt aan de orde in **Hoofdstuk 2**, waar de fysiologie van de neus wordt beschreven en een stappenplan voor een succesvolle nasale vaccin wordt geïntroduceerd. De neusholte heeft zich in de eerste plaats ontwikkeld om stoffen buiten te houden. Een

mucuslaag (snotlaag) welke het gehele epitheel overdekt wordt elke 20 minuten vervangen, waarmee alles wat in en op de mucus terechtgekomen is verwijderd wordt. Dit betekent dus dat een antigeen slechts kort in de neusholte zal verblijven en dus weinig kans krijgt om goed opgenomen te worden door het neusepitheel. Formuleren van het antigeen met plakkerige “muco-adhesieve” stoffen, zoals natriumalginaat, carbopol, chitosaan en N-trimethylchitosaan (TMC), zou de nasale verblijftijd van het antigeen kunnen verlengen.

Een tweede hindernis is de doorgang door het neusepitheel. Epitheelcellen zijn nauw met elkaar verbonden door zogenaamde “tight junctions”, die weinig ruimte laten voor transport van grote eiwitten tussen de cellen door. Het toevoegen van “tight junction openers”, stoffen die deze nauwe doorgangen tussen de cellen verwijden, zoals het bio-polymeer chitosaan, kan een tijdelijke verhoging van de doorlaatbaarheid van het epitheel veroorzaken. De aanwezigheid van gespecialiseerde “transportcellen”, zogenaamde M-cellen, in het epitheel biedt de mogelijkheid voor transport door de cel zelf heen. Zulke M-cellen transporteren bij voorkeur hele kleine deeltjes (nano- of microdeeltjes). Van dit feit zou men gebruik kunnen maken, door het antigeen in zo’n deeltje te verpakken.

Ten slotte, wanneer het antigeen het epitheel is gepasseerd, moet het worden opgenomen door dendritische cellen (DCs). Dit zijn de cellen die uiteindelijk de immuunreactie initiëren. Net als M-cellen zijn DCs in staat nanodeeltjes op te nemen. Door aan de met antigeen beladen deeltjes moleculen te koppelen die zich speciaal aan DCs binden (DC-liganden), kan de opname door DCs vergemakkelijkt worden. Om ervoor te zorgen dat de DCs vervolgens in staat zijn de uiteindelijke uitvoerders van de immuunreactie, T-cellen en B-cellen, aan te sturen, zullen de DCs geactiveerd moeten worden. Dit kan worden bevorderd door de toevoeging van een hulpstof (adjuvans) aan de formulering. De keuze van het adjuvans is belangrijk, want het kan sterke invloed hebben op de omvang en de aard van de immuunreactie.

De optimale nasale vaccinformulering zal daarom vermoedelijk bestaan uit verschillende componenten, zoals mucoadhesieve polymeren, M-cel- of DC-liganden en adjuvantia. Een effectief nasaal vaccin vraagt dus om een gecoördineerde aanpak, gericht op het vernuftig combineren van de benodigde componenten.

Methoden om de nasale verblijftijd van het antigeen, het transport door M-cellen, de opname door DCs en de activering van DCs te onderzoeken, worden besproken in de **Hoofdstukken 3-4**. Een celkweekmodel voor de M-cellen, gebaseerd op darmepitheelcellen samen gekweekt met een B-cel lijn, werd beoordeeld op zijn voorspellende waarde voor het transport van antigenen door het darmepitheel in levende muizen (**Hoofdstuk 3**). Uit een studie met deze

M-cellen bleek dat wanneer het subunit antigeen ovalbumine (OVA) werd verpakt in nanodeeltjes gemaakt van het polymeer TMC, OVA gemakkelijker werd getransporteerd dan wanneer OVA niet in nanodeeltjes was verpakt. Dit zelfde effect werd waargenomen in levende muizen, wat liet zien dat het M-cel-model voorspellende waarde heeft. Tevens is in dit hoofdstuk een kweekmodel van DCs beschreven. Witte bloedcellen geïsoleerd uit menselijke vrijwilligers werden gekweekt tot DCs, waarmee de opname van een model subunit antigeen, OVA, kon worden onderzocht. Ook hier verbeterden TMC-nanodeeltjes de associatie van OVA met DCs en stimuleerden ook nog eens de activering van de DCs. Dit alles bleek te correleren met een beduidend sterkere immuunreactie na het toediening van met OVA beladen TMC-deeltjes dan na het toedienen van een oplossing van OVA.

In **Hoofdstuk 4** wordt een nieuwe methode voor het bepalen van de nasale verblijftijd van het antigeen met behulp van een beeldvormende techniek in levende muizen geïntroduceerd. Drie verschillende soorten potentiële nasale vaccinsystemen, PLGA-, PLGA/TMC- en TMC-nanodeeltjes, werden onderzocht op hun vermogen om de verblijftijd van OVA in de neusholte te verlengen. Van de onderzochte deeltjes bleken alleen TMC-nanodeeltjes dit te doen. Muizen werden daarop nasaal gevaccineerd met de drie verschillende nanodeeltjes. Hierbij bleek dat alleen de TMC-nanodeeltjes hoge OVA antilichaamtiters opleverden, terwijl na intramusculaire toediening alle deeltjes een versterking van de immuunreactie gaven. Hieruit kan men concluderen dat het verlengen van de nasale verblijftijd een belangrijke factor voor succes is en TMC-nanodeeltjes daarom interessante vaccinformuleringen zijn. Dat laatste blijkt eens te meer uit **Hoofdstuk 5**. Hier wordt de aard van de immuunreactie die TMC en PLGA oproepen verder onderzocht. Analyse van de T-cellen en de B-cellen laat zien dat TMC-deeltjes zorgen voor een actieve immuunrespons met productie van antistoffen tot gevolg, terwijl nasale vaccinatie met PLGA-deeltjes juist leidt tot tolerantie. Dit laatste kan echter heel erg interessant zijn, omdat in het geval van auto-immuunziekten (bijvoorbeeld reuma, multiple sclerose en de ziekte van Crohn), het induceren van tolerantie wellicht een goede therapie zou kunnen zijn.

Zoals in het stappenplan aangegeven, is het toevoegen van een adjuvans ook een mogelijkheid om nasale vaccins te verbeteren. In **Hoofdstuk 6** wordt onderzocht hoe een adjuvans dan moeten worden geformuleerd. Een antigeen en een adjuvans kunnen immers samen of apart worden toegediend en wellicht is het zelfs een goed idee (met de studies in **Hoofdstuk 3-5** in het achterhoofd) om het antigeen met het adjuvans samen in een nanodeeltje te stoppen. Een veelbelovende nasale antigeendrager zijn positief geladen liposomen, welke werden gebruikt om te onderzoeken of het antigeen en het adjuvans

moeten worden gecombineerd in één transportsysteem. Liposomen zijn waterbolletjes met een buitenlaag van fosfolipiden (vetachtige moleculen die opgebouwd zijn uit o.a. verzuren en glycerol). In de liposomen kunnen moleculen zoals antigenen en adjuvantia ingebouwd worden. Muizen werden nasaal gevaccineerd met liposomen waar OVA en het bekende adjuvans CpG ingekapseld waren of met oplossingen van OVA en het adjuvans CpG (zonder liposomen). De resulterende immuunrespons werd vergeleken met vaccinatie via andere toedieningwijzen (op de huid, in de huid en rechtstreeks in een lymfeklier). Inkapseling van CpG in liposomen bleek een nadelig effect op de immuunreactie na toediening via de neus of op de huid ten opzichte van toediening van een mengsel van opgelost OVA en CpG. Interessant is overigens dat na injectie in de huid of in een lymfeknoop van in liposomen ingekapseld OVA en CpG de immuunreactie wel werd verbeterd. Uit verdere bestudering van de lymfeklieren na nasale toediening, bleek dat het inkapselen van OVA en CpG in liposomen leidde tot een verminderde hoeveelheid antigeen en adjuvant in de lymfeklieren. Deze gegevens duiden erop dat het inkapselen in een liposoom het vervoer van antigen en adjuvant door het neusepitheel nadelig beïnvloedt en daardoor bij nasale vaccinatie tot een verminderde immuunreactie leidt.

**Hoofdstukken 3-5** beschrijven TMC-nanodeeltjes als een veelbelovend systeem voor nasale toediening van subunit antigenen. **Hoofdstuk 6** laat echter zien dat nanodeeltjes ook moeilijkheden kunnen ondervinden bij met het passeren van het neusepitheel, vanwege hun relatief grote omvang. Bij elkaar opgeteld, zou men kunnen veronderstellen dat een kleiner construct dat nog steeds dezelfde eigenschappen als TMC-nanodeeltjes heeft, een nog betere keuze voor nasale toediening zou zijn. In **Hoofdstuk 7** wordt deze veronderstelling getoetst. OVA werd chemisch, via een disulfidebinding, aan een TMC-polymeer vastgekoppeld. De omvang van de verkregen TMC-OVA constructen (ca. 30 nm) is aanzienlijk kleiner dan die van TMC-nanodeeltjes (ca. 300 nm). Er werd vastgesteld dat op deze manier een omkeerbare covalente binding tussen TMC en OVA kon worden ingevoerd, onder behoud van de structuur van het antigeen. Opname van TMC-OVA conjugaat door DCs was vergelijkbaar met die van TMC/OVA-nanodeeltjes, en ruim 5 maal hoger in vergelijking met een oplossing van OVA en TMC. Na intramusculaire (d.w.z. in een spier) vaccinatie met TMC-OVA conjugaat produceerden muizen ongeveer 1000- en 100-voudig hogere OVA specifieke IgG-titers dan muizen gevaccineerd met respectievelijk alleen OVA en een mengsel van TMC en OVA. Het antilichaamniveau was zelfs iets hoger dan de niveaus verkregen na intramusculaire injectie van TMC/OVA-nanodeeltjes.

Net als TMC/OVA nanodeeltjes, verlengen TMC-OVA conjugaten de nasale verblijftijd van het antigeen (**Hoofdstuk 8**). De immunogeniciteit van nasaal toegediende TMC-OVA conjugaten werd vergeleken met die van TMC/OVA-nanodeeltjes, een oplossing van OVA en een mengsel van TMC en OVA. Muizen die nasaal waren vaccineerd met TMC-OVA conjugaat produceerden antilichamen in hun long- en neusvocht en bovendien induceerde het conjugaat hogere antilichaamniveaus in het bloed dan de andere formuleringen. Deze uitstekende resultaten met de TMC-OVA conjugaten kunnen worden toegeschreven aan een betere penetratie door het neusepitheel. In een kweekmodel diffundeerden de conjugaten in vergelijking met TMC/OVA-nanodeeltjes beter door een laag van longepitheelcellen. Bovendien leidde nasale toediening van conjugaten aan muizen tot hogere opname van OVA in de lymfeklieren in vergelijking met nasale toediening van TMC/OVA-nanodeeltjes. Kortom, de TMC-OVA nanoconjugaten verbeteren de penetratie van OVA door het nasale epitheel en verhogen zo immunogeniciteit van het antigeen. Bovendien valt hieruit af te leiden dat het tegelijkertijd afleveren van antigeen en adjuvant aan DCs belangrijk is voor het uitlokken van een immuunreactie; wellicht belangrijker zelfs dan zorgen dat het antigeen in een deeltje verpakt zit.

Een andere manier om TMC-nanodeeltjes als nasaal transportsysteem te verbeteren is ze te combineren met een adjuvans. Deze benadering wordt bestudeerd in de studies beschreven in **Hoofdstuk 9 en 10**. In de vorige hoofdstukken is aangetoond dat nasaal toegediende TMC-nanodeeltjes de antilichaamrespons tegen het ingekapselde antigeen bevorderen. Echter, in sommige gevallen is de aanmaak van antilichamen niet voldoende om een pathogeen te bestrijden en is er ook een sterke T-celreactie nodig, bijvoorbeeld bij vaccinatie tegen intracellulaire bacteriën (bijv. tuberculosebacillen) of virussen (bijv. HIV of griepvirus). In **Hoofdstuk 9** is daarom de bereiding van de TMC-nanodeeltjes gewijzigd. Terwijl in eerdere hoofdstukken de positief geladen TMC-polymeren fysisch verknoopt werden door gebruikmaking van het negatief geladen molecuul tripolyfosfaat (TPP), werd hier TMC verknoopt met het eerder genoemde adjuvans CpG. Dit is een negatief geladen adjuvans dat bekend staat om het uitlokken van een T-celreactie. TMC/CPG/OVA-deeltjes hebben vergelijkbare fysisch-chemische eigenschappen als TMC/TPP/OVA-deeltjes; bijv. de deeltjesgrootte (ca. 350 nm) en de elektrische lading (+21 mV). Nasale toediening van TMC/CPG/OVA- en TMC/TPP/OVA-deeltjes aan muizen resulteerde in vergelijkbare antistofwaarden (ca. 1000 maal hoger dan die na nasale toediening van een oplossing van OVA). Echter, nasale toediening van TMC/CPG/OVA-deeltjes, in vergelijking met TMC/TPP/OVA-deeltjes, resulteerde in een 10 maal hoger niveau aan OVA-specifieke IgG2a-

antistoffen en een toename van het aantal IFN- $\gamma$  producerende T-cellen. Dit toont aan dat TMC/CpG/OVA-deeltjes veel beter de T-cel gemedieerde immuunreactie kunnen bevorderen dan TMC/TPP/OVA-deeltjes. Kortom, TMC/OVA nanodeeltjes, met CpG als adjuvans en crosslinker, is een “all-round” vaccindragersysteem, omdat het in staat is zowel antistofproductie als T-celactivering te bewerkstelligen.

Uiteindelijk worden in **Hoofdstuk 10** naast CpG diverse andere adjuvantia beschreven in combinatie met TMC-deeltjes. Verschillende receptoren op DCs kunnen worden aangezet om de DC te activeren. Zo zijn er de zogenaamde Toll like receptoren (TLR) en NOD-like receptoren die kunnen worden geactiveerd door interactie met respectievelijk TLR- of NOD-liganden. De onderzochte TLR-liganden, lipopolysaccharide (LPS), PAM3CSK4 en CpG, en de NOD-2-ligand muramyl dipeptide (MDP) hebben daarom de potentie om DCs te activeren. Deze liganden werden samen met OVA ingekapseld in TMC-nanodeeltjes door verknoping met TPP. De bereiding van de deeltjes was zodanig geoptimaliseerd dat hun fysieke kenmerken zoals grootte en lading vergelijkbaar waren. De effectiviteit van adjuvant geladen TMC deeltjes werd beoordeeld door de nasale vaccinatie in muizen, in vergelijking met vaccinatie in de huid. TMC/OVA-nanodeeltjes met LPS of MDP ontlokten de hoogste antistof titers na nasale vaccinatie. Niet alle adjuvantia waren echter even effectief en hun effectiviteit bleek afhankelijk te zijn van de toedieningsroute. Deze studie toont aan dat de combinatie van TMC-nanodeeltjes als dragersysteem met een adjuvans, de immuunreactie aanzienlijk kan verbeteren. De selectie van het adjuvant is echter niet willekeurig en hangt af van de toedieningsroute.

Met behulp van deze bevindingen kunnen we een aantal conclusies trekken (**Hoofdstuk 11**). De belangrijkste obstakels voor nasale subunit vaccins zijn, (i) de korte verblijftijd van het antigeen in de neus, (ii) de beperkte opname van het antigeen door het neusepitheel, (iii) de gelimiteerde opname van het antigeen door DCs en (iv) inductie van tolerantie.

Deze vier punten kunnen verholpen worden door het antigeen te combineren met hulpstoffen of te verpakken in nanodeeltjes, maar we hebben ook kunnen concluderen dat de ene maatregel de ander soms tegenwerkt. Zo kan het samen inpakken van antigeen en adjuvans in een nanodeeltje de opname door DCs verbeteren en tolerantie voorkomen, maar zorgt het voor een verminderde opname door het neusepitheel. Gelukkig geldt dat niet voor alle obstakels. Zo lijkt het toevoegen van een plakkerige “muco-adhesieve” stof aan de formulering om de nasale verblijftijd van het antigeen te verlengen een eenvoudige, effectieve maatregel. Het lijkt niet uit te maken of de muco-adhesieve stof los wordt toegevoegd of in

de vorm van een nanodeeltje. Een adjuvans daarentegen lijkt bij voorkeur wel degelijk (fysisch of chemisch) aan het antigeen gekoppeld te moeten zijn. Op basis van hiervan zou een ideale nasale formulering er dus als volgt uit kunnen zien:

Een antigeen gekoppeld aan een adjuvans, met daaraan een muco-adhesieve stof toegevoegd.

De mucoadhesieve stof (bijvoorbeeld TMC) verlengt de nasale verblijftijd (i). Een antigeen gekoppeld aan een adjuvans kan de opname door DCs verbeteren (iii) en tolerantie voorkomen (iv) omdat het adjuvans de DCs activeert. Omdat zo'n antigeen-adjuvansconstruct vrij klein is, is het ook nog eens aannemelijk dat het (in vergelijking met nanodeeltjes) beter wordt opgenomen door het nasale epitheel (ii).

Natuurlijk is dit nu nog slechts toekomstmuziek en betreffen de bevindingen die in dit proefschrift beschreven zijn slechts muizenstudies, die in de praktijk wel eens afwijken van studies in mensen. Verder onderzoek omtrent de werking en eventuele bijeffecten van bijvoorbeeld TMC en adjuvantia zal moeten uitwijzen in hoeverre deze voor bruikbaar zijn voor de ontwikkeling van veilige en effectieve nasale vaccins voor toepassing bij de mens. Ook zal het productieproces en de wijze van toediening zo goedkoop mogelijk gehouden moeten worden om nasale vaccins concurrerend met injecteerbare vaccins te maken.



## List of abbreviations

|               |                                           |
|---------------|-------------------------------------------|
| ANOVA         | Analysis of variance                      |
| APC           | Antigen presenting cell                   |
| Caco-2        | Colon carcinoma cell                      |
| CBF           | Ciliary beat frequency                    |
| CpG           | Unmethylated C-G motif                    |
| CS            | Chitosan                                  |
| CT            | Cholera toxin                             |
| CTB           | Cholera toxin beta subunit                |
| CTL           | Cytotoxic T-lymphocyte                    |
| DC            | Dendritic cells                           |
| DCM           | Dichloromethane                           |
| DLS           | Dynamic light scattering                  |
| FAE           | Follicle-associated epithelium            |
| FBS           | Foetal Bovine Serum                       |
| FITC          | Fluorescein isothiocyanate                |
| HbsAg         | Hepatitis B surface antigen               |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gamma                          |
| IgG           | Immunoglobulin G                          |
| IgG1          | Immunoglobulin G subtype 1                |
| IgG2a         | Immunoglobulin G subtype 2a               |
| IgM           | Immunoglobulin G                          |
| IL            | Interleukin                               |
| i.n.          | intranasal                                |
| ISCOM         | Immune stimulatory complex                |
| LC            | Langerhans cells                          |
| LE            | Loading efficiency                        |
| LN            | Lymphnode                                 |
| LPS           | Lipopolysaccharide                        |
| LT            | <i>Escherichia coli</i> heat labile toxin |
| M-cell        | Microfold cell                            |
| MHC           | Major histocompatibility complex          |
| MDP           | muramyl dipeptide                         |
| NALT          | Nasal associated lymphoid tissue          |

|       |                                                      |
|-------|------------------------------------------------------|
| NLR   | NOD like receptor                                    |
| NOD   | Nucleotide-binding oligomerization domain containing |
| NP    | Nanoparticles                                        |
| OVA   | Ovalbumin                                            |
| PAM   | Palmitol                                             |
| PAMP  | Pathogen associated molecular pattern                |
| PBS   | Phosphate buffered saline                            |
| PDI   | Polydispersity index                                 |
| PLGA  | poly(lactic-co-glycolic acid)                        |
| PRR   | Pathogen recognition receptor                        |
| slgA  | secretory Immunoglobulin A                           |
| SD    | Standard deviation                                   |
| SEM   | Standard error of the mean                           |
| SPDP  | N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate        |
| TEER  | Transepithelial electrical resistance                |
| Th1   | T helper 1                                           |
| Th2   | T helper 2                                           |
| TMC   | N-trimethyl chitosan                                 |
| TLR   | Toll-like receptor                                   |
| TPP   | Triphosphosphate                                     |
| UEA-1 | <i>Ulex europaeus</i> 1 lectin                       |
| ZP    | Zetapotential                                        |

## List of Publications

1. Slütter B, Bal S, Verheul R, Bouwstra J, Jiskoot W. **Adjuvant selection and site dependant effects for nasal and intradermal subunit vaccination using N-trimethyl chitosan nanoparticles as a delivery system.** (Submitted)
2. Slütter B, Bal S, Zhi D, Jiskoot W, Bouwstra J. **Adjuvant effect of cationic liposomes and CpG depends on administration route.** (Submitted)
3. Slütter B, Bal S, Que I, Kaijzel E, Löwik C, Bouwstra J, Jiskoot W. **Antigen-adjuvant conjugates for nasal vaccination, an improvement over the use of nanoparticles?** Mol Pharm (2010), in press
4. Mohanan, D., Slütter, B., Jiskoot, W., Bouwstra, J.A., Henriksen-Lacey, M., Perrie, Y., Kündig, T.M., Gander, B., and Johansen, P. **Administration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems.** *J. Control. Release* (2010), in press.
5. Slütter B and Jiskoot W. **Dual role of CpG as immune modulator and physical crosslinker in ovalbumin loaded N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for nasal vaccination.** *J Contr Release* 2010 148: 117-121
6. Slütter B, Keijzer C, Bal S, Que I, Kaijzel E, Löwik, Mallants R, Augustijns P, Broere F, van Eden W, Jiskoot W. **Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: Nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen.** (*Vaccine*, 2010 28:6282–91
7. Hagenaars N, Mania M, de Jong P, Que I, Nieuwland R, Slütter B, Glansbeek H, Heldens J, van den Bosch H, Löwik C, Kaijzel E, Mastrobattista E, Jiskoot W. **Role of trimethylated chitosan (TMC) in nasal residence time, local distribution and toxicity of an intranasal influenza vaccine.** *J Control Release*. 2010 144(1):17-24
8. Slütter B, Soema PC, Ding Z, Verheul R, Hennink W, Jiskoot W. **Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen.** *J Control Release*. 2010 Apr 19;143(2):207-14.
9. Bal SM, Slütter B, van Riet E, Kruithof AC, Ding Z, Kersten GF, Jiskoot W, Bouwstra JA. **Efficient induction of immune responses through intradermal vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations.** *J Control Release*. 2010 Mar 19;142(3):374-83.
10. Slütter B\*, Plapied L\*, Fievez V, des Rieux A, Schneider Y, van Riet E, Jiskoot W, Préat V. **Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination.** *J Control Release*. 2009 Sep 1;138(2):113-21

11. Slütter B\*, Hageraars N\*, Jiskoot W. **Rational design of nasal vaccines.** J Drug Target. 2008 Jan;16(1):1-17.
12. Kel JM, Slütter B, Drijfhout JW, Koning F, Nagelkerken L. **Mannosylated self-peptide inhibits the development of experimental autoimmune encephalomyelitis via expansion of nonencephalitogenic T cells.** J Leukoc Biol. 2008 Jul;84(1):182-90.

## Curriculum Vitae

Bram Slütter was born on February 8th 1983 in Warnsveld, The Netherlands. After his graduation from high school in 2001 (Staring College, Lochem), he studied Bio-Pharmaceutical Science at the University of Leiden, The Netherlands. Before receiving his master degree in 2006, he did 2 research internships; in 2005 at the Division of Biopharmaceutics of the Leiden Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) on mast cell degranulation and blood coagulation under the supervision of Saskia de Jager and Eric Biessen, and in 2006 at TNO Leiden on a project concerning T-cell



responses in experimental autoimmune encephalitis, under supervision of Junda Kel and Lex Nagelkerke. In October 2006 Bram started his PhD project on “Nasal vaccine delivery: alternatives for conventional multiple injection vaccines” led by Prof. Jiskoot and Prof. Bouwstra at the Division of Drug Delivery Technology of the LACDR. This PhD project was performed within the framework of Top Institute Pharma project number D5-106, a collaboration between Leiden University, Utrecht University, Vrije Universiteit Amsterdam and the Netherlands Vaccine Institute. In 2007 he worked as visiting scientist at the lab of Prof Veronique Préat in Brussels for 4 months. From November 2010 he works as postdoctoral reseacher with Prof. Harty at the University of Iowa (Iowa City, IA).