



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of hyaluronan-based dissolving microneedle arrays for dermal vaccination

Leone, M.

Citation

Leone, M. (2020, December 10). *Development of hyaluronan-based dissolving microneedle arrays for dermal vaccination*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138252>

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/1887/138252>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138252> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Leone, M.

Title: Development of hyaluronan-based dissolving microneedle arrays for dermal vaccination

Issue date: 2020-12-10

Nederlandse samenvatting

SAMENVATTING

Vaccinatie is een van de meest effectieve methoden voor het verminderen van infectie-gerelateerde morbiditeit en mortaliteit. Het principe van vaccinatie werd voor het eerst gepubliceerd door Edward Jenner in 1796 [1] en, sinds de ontwikkeling van de microbiologie in de tweede helft van de 19e eeuw, zijn er talloze vaccins ontwikkeld en goedgekeurd voor zowel menselijk- als veterinair gebruik.

Verscheidene factoren kunnen de vaccinatiegraad beïnvloeden [2-4]. Hieronder vallen onder andere de kosten, zorgen van de bevolking aangaande de veiligheid en effectiviteit [5], religieuze overtuigingen, en de verspreiding van onjuist informatie door anti-vaxxers [6]. Andere factoren zijn gerelateerd aan de manier waarop de vaccinaties worden toegediend. Het gebruik van injecteerbare vaccins wordt door een groot deel van de doelgroep gezien als hinderlijk. Daarnaast zorgen prikaccidenten en hergebruik van injectienaalden ook voor gezondheidsrisico's voor zowel het zorgpersoneel als de gevaccineerde. Om deze problemen te voorkomen, kan vaccinatie op een minimaal invasieve- en pijnvrije manier de vaccinatiegraad verbeteren.

Dermale immunisatie via micronaalden is een veelbelovend alternatief voor de klassieke toediening van vaccins door middel van intramusculaire en subcutane injecties. De huid is een immunocompetent orgaan welke veel antigeen-presenterende cellen bevat, zoals Langerhans cellen en dendritische cellen, om een effectieve immuunrespons op te wekken. Dit is een gevolg van het feit dat de huid, in tegenstelling tot spier- en onderhuids weefsel, direct is blootgesteld aan de omgeving en daarmee het lichaam beschermt tegen ziekteverwekkers, niet alleen door het vormen van een effectieve fysieke barrière, maar ook door de daaronder gelegen omvangrijke immuunbewaking.

Van de verschillende soorten micronaalden [7] ligt de focus van dit proefschrift op de ontwikkeling van oplosbare micronaalden, waarbij hyaluronzuur (HA) als matrixpolymeer wordt gebruikt.

Dit proefschrift begint met een gedetailleerd overzicht van onderzoek en ontwikkeling naar oplosbare micronaalden (*Hoofdstuk 2*), waarin methoden worden beschreven voor het produceren van oplosbare micronaalden, evenals de karakteriseringsmethoden en aspecten van antigeen-stabiliteit. Verder bevat dit hoofdstuk een gedetailleerd overzicht waarin de immunogeniciteit van verschillende antigenen, welke ingekapseld zijn in oplosbare micronaalden, wordt beschreven. Hierin wordt het verschil in de opgewekte immuunrespons na immunisatie vergeleken tussen oplosbare micronaalden en conventionele injecties.

Hieruit blijkt dat de respons na dermale immunisatie i.h.a. op zijn minst vergelijkbaar is met conventionele injecties. Daarnaast worden verschillende factoren besproken die van invloed

zijn op de immunogeniciteit: naast het gebruik van adjuvantia (componenten die het aangeboren immuunsysteem stimuleren), kan het ontwerp van de micronaald zoals de naaldafstand en -geometrie ook van invloed zijn. Ten slotte wordt de huidige status van de klinische ontwikkeling van oplosbare micronaalden besproken. Deze bevindt zich nog in een vroeg stadium, maar vaccins geformuleerd in oplosbare micronaalden kunnen binnen een decennium op de markt verschijnen.

De studie beschreven in *Hoofdstuk 3* focust zich op de ontwikkeling van een digitaal aangestuurde micronaald applicator om de micronaalden in de huid te brengen via impact insertie (snelheid) of via statische kracht. Zes micronaald arrays met verschil in geometrie, naalddichtheid en/of bestaande uit verschillende materialen werden aangebracht op *ex vivo* humane huid met variërende snelheden en drukkrachten om het verschil in penetratie efficiëntie en antigeen afgifte te analyseren. Het aanbrengen van micronaald arrays door middel van impact insertie met een specifieke applicatiehoek resulteerde in een efficiëntere dermale penetratie in vergelijking met applicatie via statische kracht. De dosering in de huid wordt positief beïnvloed door het verhogen van de snelheid of de kracht, waarmee tevens het belang wordt aangetoond van het gebruik van een micronaald applicator voor een gecontroleerde toepassing in de huid.

In *Hoofdstuk 4* wordt een nieuw ontwerp beschreven voor het produceren van oplosbare micronaalden via micromolding, waarmee het verlies van antigenen aan structuren buiten de individuele micronaalden wordt verminderd. In het originele productieproces werd een gietvorm gebruikt waarin 9 arrays tegelijkertijd werden gemaakt, die aan de achterzijde verbonden werden een enkele matrix laag. Deze backplate zorgde voor een niet-homogene antigeen verdeling tussen de arrays. De nieuwe methoden voorkomt dit probleem doordat één gietvorm 9 afzonderlijke arrays bevat. Vervolgens werd met behulp van dit ontwerp onderzocht in welke mate oplosbare micronaalden met hogere antigeen dosis konden worden vervaardigd. Oplosbare micronaalden met een ratio ovalbumine:hyaluronzuur 1:1 (w/w) konden worden geproduceerd, welke uitstekende scherpte en penetratie efficiëntie vertoonden, zelfs na opslag bij hogere temperaturen en hoge luchtvochtigheid. Het modelantigeen aggregaarde niet tijdens het productieproces. Er was echter wel een verschil merkbaar in de oplosbaarheid van de micronaalden in de huid; een hogere antigeenbelading leidde tot een verminderd opgelost volume na eenzelfde insertietijd in *ex vivo* humane huid. Tenslotte toonde een immunisatiestudie in muizen aan dat oplosbare micronaalden een antilichaam respons induceerden welke vergelijkbaar is met conventionele immunisatie. Daarnaast ontwikkelde de antilichaam respons zich sneller in vergelijking met dermale immunisatie via een enkele holle micronaald.

In *Hoofdstuk 5* werd het optimale molecuulgewicht (MW) van HA voor de vervaardiging van oplosbare micronaalden bepaald met betrekking tot micronaald integriteit en immuunmodulerende eigenschappen. Deze studies zijn uitgevoerd omdat eerdere publicaties aantoonde dat HA met een laag MW het aangeboren immuunsysteem zou

kunnen stimuleren. Het MW van hyaluronzuur varieerde tussen de 4.8 kDa tot 1.8 MDA, en allen waren immunologisch inert. Antilichaamresponsen noch CD4 T-cel responsen tegen het model antigeen ovalbumine werden beïnvloed door aanwezigheid van HA met verschillende MW. Echter niet alle moleculaire massa's van HA binnen het aangegeven bereik waren geschikt voor de productie van micronaalden; een te hoog MW resulteerde in een te viskeuze formulering voor micromolding, terwijl een te laag MW zorgde voor fragiele micronaald arrays. Daarnaast vereisten oplosbare micronaalden met een hoog MW een langere insertietijd in de huid in vergelijking met de lage MW formuleringen, waardoor uiteindelijk 20 kDa werd geselecteerd voor de vervaardiging van oplosbare micronaalden.

Het doel van *Hoofdstuk 6* was om te bepalen of herhaalde fractionele intradermale toediening van difterietoxoïd zorgt voor een verbetering in respons in vergelijking met een enkele toediening in de aan- of afwezigheid van adjuvantia met zowel de holle- als de oplosbare micronaalden. Na een initiële screening werden poly(I:C) en gibbsiet, een adjuvant gebaseerd op aluminiumhydroxide, geselecteerd en ingekapseld met de difterietoxoïd in oplosbare micronaalden in volledige of herhaalde fractionele difterietoxoïd (-adjuvant) dosis. Ongeacht de samenstelling was het mogelijk om scherpe oplosbare micronaalden te vervaardigen, die in staat waren om de huid te penetreren en vervolgens binnen 20 minuten op te lossen en daarmee de difterietoxoïd (-adjuvant) dosis af te leveren. Vaccinatie door middel van oplosbare micronaalden zonder toegevoegd adjuvant leidde tot een verhoogde respons in vergelijking met toediening via een enkele holle micronaald. Herhaalde doseringen met oplosbare micronaalden zorgden niet voor een extra verhoging in de immuunreactie.

Echter, herhaalde fractionele doseringen met een holle micronaald leidde tot een hogere immuunrespons in vergelijking met een enkele volledige dosis, maar bereikte uiteindelijk hetzelfde responsniveau als toediening via oplosbare micronaalden. Daarnaast zorgde inkapseling van het adjuvant samen met difterietoxoïd in oplosbare micronaalden niet voor een verdere verhoging van de immuunrespons. De reactie na toediening van oplosbare micronaalden zonder adjuvant was vergelijkbaar met die van conventionele subcutane injecties van difterietoxoïd-AIPO₄ in een 15 maal hogere antigeendosis, en difterietoxoïd-poly (I:C) adjuvant in een vergelijkbare dosis. Hieruit kan geconcludeerd worden dat dermale toediening van een enkele, volledige dosis difterietoxoïd via oplosbare micronaalden leidt tot een verbeterde respons, zelfs zonder het gebruik van adjuvantia. Op basis van de resultaten van dit onderzoek is het mogelijk dat immunisatie via oplosbare micronaalden zal resulteren in een efficiëntere immuunreactie, waarbij – in tegenstelling tot subcutane toediening - slechts één toediening met een lagere antigeen dosis vereist is.

PERSPECTIEF

Oplosbare micronaalden: uitdaging en volgende stappen in de ontwikkeling

Hoewel de verwachtingen hoog gespannen zijn om oplosbare micronaalden als vaccin te kunnen toepassen, moeten de farmaceutische bedrijven nog een aantal hordes nemen. Voordat de met vaccin geladen micronaalden op de markt zullen verschijnen, moet de toedieningsnauwkeurigheid verhoogd worden en de toediening van micronaalden arrays op de huid vereenvoudigd worden. Om dit te bereiken moet het onderzoek gericht zijn op i) de vaccinformulering met o.a. aandacht voor de stabiliteit, ii) efficiënte insertie en oplosbaarheid van de micronaalden in de huid, iii) steriliteit van het product, waarbij nieuwe productie stappen ontwikkeld moeten worden, iv) adjuvantia die mogelijk toegevoegd moeten worden voor minder immunogene antigenen, v) het productieproces waarbij ook het antigeenverlies tijdens de fabricage in beschouwing moet worden genomen.

Een eerste uitdaging waarmee we geconfronteerd worden tijdens de fabricage van de micronaalden is het verlies van het antigeen in de gietvorm, wat kostenverhogend werkt. Toekomstig onderzoek moet daarom gericht zijn om het vaccin voor in de punt van de naald te gieten [10,11]. Dit zou vaccinatie met behulp van micronaalden betaalbaar maken voor ontwikkelingslanden.

Een tweede kritisch punt is een efficiënte en volledige insertie in de huid. Wanneer als gevolg van de geometrie of een gebrek aan lengte een onvolledige insertie plaats vindt, zal de naald niet volledig oplossen en dit zou leiden tot een niet reproduceerbare toediening en verlies van antigenen. Dit gebeurt ook indien patiënten de pleister met micronaalden niet lang genoeg dragen totdat de micronaalden volledig opgelost zijn. Om dit probleem het hoofd te bieden zijn diverse voorstellen gedaan zoals i) een pijlvormig oplosbare kop van de naald [12] samengesteld uit een polymeer die bij insertie los laat van de metalen schacht waarmee het verbonden is en zo in de huid vastgehouden wordt, totdat de naald volkomen opgelost is en ii) micronaalden te gebruiken zonder pleister, zodat een systeem gebruikt kan worden waarbij alleen individuele, medicijn bevattende oplosbare naalden in de huid worden geïnjecteerd [13]. Hoe dan ook, hier kleven ook nadelen aan: i) langere micronaalden (>600 μm [12]) die hoewel potentieel meer dan kortere naalden [14] de immuunrespons verhogen, veroorzaken waarschijnlijk ook meer pijn [15], ii) het gebruik van een apparaat, speciaal voor de toediening van micronaalden, vereist getraind personeel, die de kosten van deze toepassing verder opdrijft.

Het is van belang dat de micronaalden steriel zijn. In dit licht bezien is steriele fabricage essentieel [16]. Sterilisatiemethoden moeten in het productieproces ingebouwd worden, zonder dat het vaccin gemodificeerd wordt. Dit kan kostenverhogend werken. Zo zal bijvoorbeeld eindtraps sterilisatie met behulp van gamma straling, hitte behandelingen al dan niet met behulp van een magnetron of autoclaaf, minder duur zijn dan aseptische bereiding. Dit kan echter de micronaalden en hun inhoud beschadigen. Sommige van de

gebruikte materialen bezitten antibacteriële eigenschappen. Zij laten geen groei van bacteriën zien bij langdurige opslag en zullen hoogst waarschijnlijk geen infecties in de huid veroorzaken [17]. In dit geval, wanneer de initiële contaminatie erg laag is, kan het voldoende zijn om zonder steriele fabricage de micronaalden goedgekeurd te krijgen.

Voor minder immunogene antigenen zal de toediening van adjuvantia essentieel zijn om voldoende immuunrespons op te wekken, maar vanwege veiligheidsvoorschriften zijn niet al die stoffen geschikt voor dermale toediening. Als voorbeeld kunnen de klassieke op aluminium gebaseerde adjuvantia dienen, die een hardnekkige ontsteking veroorzaken bij intradermale injectie in muizen [18]. Enerzijds zal het vermijden van adjuvantia het vaccin minder complex maken, anderzijds kan het leiden tot een lagere werkzaamheid.

Een belangrijke stap in de productontwikkeling is het opschalen van het bereidingsproces. Er zijn talrijke productiemethoden op kleine schaal beschreven (zie Hoofdstuk 2), die processtappen bevatten die moeilijk opschaalbaar zijn (bv. centrifuge en het gebruik van vacuüm). Bovendien zijn richtlijnen vereist met betrekking tot GMP, farmacopee referenties, en geschikte kwaliteitscontrole testen [19]. Speciale voorschriften over verpakking, verwijdering, en verzekering van correct gebruik zijn daarbij ook nodig. Door het innovatieve karakter van deze technologie blijft het gebrek aan regelgeving echter een barrière voor de beschikbaarheid van oplosbare micronaalden. Hoewel het gebruik van oplosbare micronaalden voor vaccinatie veelbelovend is, zijn er nog geen producten op de markt. Dit zal naar verwachting veranderen in het komende decennium, aangezien verscheidene producten in klinische ontwikkeling zijn [8,9]. Op dit moment zijn bedrijven bezig met het opzetten van een productielijn van oplosbare micronaalden voor huidverzorgingscosmetica [20] en voor de levering van biologische producten voor de huid [21]. Dit laatste met een succesvol afgeronde fase 2a klinische evaluatie.

Zodra de productieprocessen zijn geoptimaliseerd en de regulatoire hindernissen zijn opgelost, kan vaccinatie door middel van oplosbare micronaalden een hoeksteen in het verbeteren van de vaccinatiegraad over de hele wereld worden.

Het grote potentieel van oplosbare micronaalden

Hoewel oplosbare micronaalden nog een lange ontwikkelingsroute te gaan hebben, alvorens gereed te zijn als regulier product, vormen zij een groot potentieel boven andere micronaald types: oplosbare micronaalden bestaan uit droge formuleringen die i.h.a. een betere vaccinstabiliteit hebben dan vloeibare formuleringen, die in traditionele vaccinatieroutes gebruikt worden [22,23]. Door deze verhoogde stabiliteit kunnen deze micronaalden de noodzaak van een koude keten omzeilen en zijn ze ideaal voor vaccinatiecampagnes in ontwikkelingslanden. Dit zou de vaccinatiekosten voor vervoer en opslag aanzienlijk verminderen en daardoor de vaccinatiegraad en de efficiëntie van de vaccinatieprogramma's kunnen verhogen.

Bovendien laat vaccinatie door middel van oplosbare micronaalden in de meeste gevallen een vergelijkbare of zelfs hogere respons zien dan bij een conventionele injectie (zie Hoofdstuk 2). De besparing van de antigeendosis, zoals beschreven in Hoofdstuk 6, biedt een ander voordeel voor vaccinatie via de huid door oplosbare micronaalden.

Het belang van het toepassen van micronaalden

In dit proefschrift zijn twee soorten micronaalden beschreven voor het toedienen van vaccins: een holle micronaald en oplosbare micronaalden. Beide types vereisen toedieningsapparaten.

Het gecontroleerd en nauwkeurig injecteren van een specifiek volume van het vaccin in de huid door middel van een holle micronaald vereist een complex apparaat met een applicator en een pomp om tot een gecontroleerde diepte door te dringen in de huid.

Oplosbare micronaalden kunnen snel toegediend worden en het kost relatief weinig tijd om ze in de huid op te laten lossen. Het gebruik van een applicator is echter mogelijk niet haalbaar in gebieden met een gebrek aan infrastructuur. Technische storingen of verlies van de applicator kunnen de immunisatieprogramma's lokaal verstoren. Boven zal het gebruik van een apparaat voor de toepassing de vaccinatiekosten verhogen.

In dit opzicht zou het een belangrijke verbetering zijn als de micronaalden gebruikt kunnen worden zonder het gebruik van een applicator. Hierdoor kan de behoefte aan geschoold personeel worden vermeden en zou zelftoediening mogelijk worden, vooral op afgelegen plaatsen in de wereld of in het geval van het uitbreken van een pandemie. Studies tonen aan dat het gebruik van een applicator de efficiëntie en reproduceerbaarheid van het inbrengen van micronaalden verbetert[24] en dat korte micronaalden (300 μm), maar ook minder scherpe micronaalden, een lagere penetratie-efficiëntie in de huid kunnen hebben dan langere (>550 μm)[25-27] en dat het gebruik van een applicator bij kortere naalden dus cruciaal kan zijn voor efficiënte toediening in de huid. Handmatige toepassing, waarbij het gebruik van een applicator wordt vermeden, is mogelijk en succesvol [8, 9] indien langere micronaalden worden gebruikt. In dit geval kunnen lange naalden nog steeds beschouwd worden als minder invasief dan injectienaalden, en veroorzaken ze veel minder pijn. Tabel 1 geeft een overzicht van de voor- en nadelen van het gebruik van een applicator bij het aanbrengen van micronaalden.

Tabel 1. Voor- en nadelen van handmatig toediening en toepassing door middel van een applicator.

Handmatige toediening		Toepassen van een applicator	
Voordelen	Nadelen	Voordelen	Nadelen
Lagere productiekosten	Beperking in micronaald lengte: alleen lange micronaalden	Geen beperking in lengte (toediening van korte micronaalden mogelijk)	Hogere productiekosten
Geen getraind personeel nodig	Gebruik van langere micronaalden is pijnlijker	Efficiënter en reproduceerbaarder injectie	Getraind personeel nodig
			Afhankelijk van technologie ter plekke

De rol van hyaluronan bij vaccinatie door middel van oplosbare micronaalden

Zoals aangetoond in hoofdstuk 5, heeft het hyaluronzuur dat gebruikt wordt als matrixmateriaal geen effect op de immuunrespons na vaccinatie door oplosbare micronaalden, ondanks de gerapporteerde immuunmodulerende eigenschappen van hyaluronzuur met een laag molecuulgewicht [28]. Echter, volgens de literatuur kan hyaluronzuur geconjugeerd met ovalbumine dendritische cellen *in vitro* efficiënter activeren dan ovalbumine alleen [29] en conjugatie kan de toediening van grotere verbindingen via het lymfestelsel verbeteren[30]. Bovendien leidde intramusculaire injectie van hyaluronzuur-ovalbumine-conjugaten tot een hogere immuunrespons dan ovalbumine alleen [29]. Daartoe zou het interessant zijn om hyaluronan-antigeenconjugaten in te kapselen in oplosbare micronaalden om immunogeniciteit te bereiken.

CONCLUSIE

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek toonde aan dat oplosbare micronaalden die gebruikt worden voor de afgifte van vaccins via de huid een antigeen specifieke immuunrespons kan oproepen die vergelijkbaar is met de conventionele subcutane route. Er is echter verder onderzoek nodig om deze technologie te optimaliseren en verschillende productie- en toepassingshindernissen te overwinnen om het onderzoek te vertalen naar werkzame commerciële producten.