



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transcutaneous subunit vaccine delivery. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays

Ding, Z.

Citation

Ding, Z. (2010, February 23). *Transcutaneous subunit vaccine delivery. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14943>

Version: Corrected 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/1887/14943>

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

Transcutane subunit vaccin toediening

Een gecombineerde benadering van vesiculaire formuleringen en matrices van micronealden

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op dermale vaccinatie, d.w.z. vaccinatie via de huid.

De natuurlijke functie van de huid is de barrièrefunctie. Die wordt vooral gevormd door de buitenste dode huidlaag, de zogenaamde hoornlaag. In de daaronder gelegen levende huid bevinden zich o.a. dendritische cellen (DCs), die een cruciale rol spelen bij het op gang brengen van de immuunrespons. Dermale vaccinatie is vooral attractief omdat dit pijnloos kan gebeuren omdat pijnzenuwen afwezig zijn in het buitenste deel van de huid en omdat de concentratie DCs in de huid hoog is. Een hoge concentratie DCs maakt het mogelijk om efficiënt te vaccineren. Echter de grootste uitdaging is om het antigeen (het actieve gedeelte van het vaccin) in voldoende mate door de hoornlaag te transporteren in de richting van de DCs.

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift werden zowel micronealden als vesiculaire formuleringen gebruikt om het transport van het antigeen door de hoornlaag te verhogen. Micronealden zijn naalden korter dan 1 mm met een diameter van 300 μm of kleiner. De voor dit proefschrift gebruikte naalden zijn massief en worden gebruikt om de huid vóór te behandelen waarna het vloeibare vaccin wordt opgebracht. Vesiculaire formuleringen bevatten deeltjes met een waterige kern omsloten door een hydrofobe laag van oppervlakte-actieve stoffen. De vesicles zijn, afhankelijk van hun samenstelling, elastisch en de penetratie van stoffen door de huid bevorderen. Tevens werden aan de formuleringen adjuvantia toegevoegd om de immunogeniciteit te verhogen.

Om het transport van het antigeen door de huid te bevorderen werd eerst het gebruik van micronealden onderzocht, waarbij kleine gaatjes geprikt worden, zodat de barrièrefunctie van de huid vermindert en het antigeen efficiënter door de hoornlaag getransporteerd wordt in de richting van de DCs. Eerst werd onderzocht of de micronealden gaatjes veroorzaken in de huid. Dit

onderzoek staat beschreven in **hoofdstuk 3**. Micronaalden werden getest met een lengte variërend tussen 300 en 900 μm . De naaldjes werden gemonteerd in een plaatje, zodanig dat er 16 naaldjes in een 4x4 geometrie gerangschikt zijn. Het bleek dat micronaaldjes met een lengte van minstens 550 μm gaatjes in de huid veroorzaken, terwijl de kortere naaldjes niet noemenswaardig in de huid prikten. Niet alleen de naaldlengte maar ook de snelheid waarmee de naaldjes de huid raken bepaalt of de hoornlaag gepenetreerd wordt. Bij te lage snelheid rekt de elastische huid mee en vouwt zich om de micronaalden. Daarom werd een speciale elektrische applicator ontwikkeld waarmee de naalden met constante, relatief hoge snelheid gebruikt kunnen worden. Het bleek inderdaad dat met behulp van de applicator een array met kortere micronaalden (245-300 μm lang) de muizenhuid kan penetreren op een uniforme en reproduceerbare manier. Dermale vaccinatie met difterie toxoid en een influenza antigeen werd uitgevoerd met cholera toxine (CT) als adjuvans. Hiertoe werd de huid al dan niet voorbehandeld met de micronaalden, waarna vervolgens de formulering opgebracht werd. In geval van difterie toxoid, was de voorbehandeling met de micronaalden noodzakelijk om substantiële immunogeniciteit te bereiken. Vergeleken met dermale toediening zonder voorbehandeling, zorgde de micronaalden voorbehandeling voor een 1000-voudige verhoging in immunogeniciteit. Toevoeging van CT verhoogde de immuunreactie verder tot een niveau dat vergelijkbaar was met de immuunrespons na subcutane toediening van difterie toxoid geadsorbeerd aan aluminiumfosfaat, de postieve controle. Met het influenza antigeen werden andere resultaten bereikt. De voorbehandeling met micronaalden zorgde niet voor een significant effect, maar de toevoeging van CT verhoogde de immunogeniciteit sterk. Deze resultaten tonen aan dat het effect van de voorbehandeling met micronaalden voor dermale vaccinatie afhankelijk is van het gebruikte antigeen. Er werd besloten in alle vervolgstudies difterie toxoid te gebruiken.

Vaccins, die toegediend worden via de huid, worden opgenomen door andere klassen DCs dan na conventionele intramusculaire of subcutane injecties. Daarom werd de invloed van verschillende adjuvantia op het type afweerreactie na dermale toediening met difterie toxoid onderzocht. Deze studies staan beschreven in **Hoofdstuk 4**. De immunogeniciteit werd verhoogd door de voorbehandeling met micronaalden. De toevoeging van een adjuvans verhoogde de immunogeniciteit verder in deze volgorde: Quil A < CpG < CT. Het gebruik van adjuvantia had ook invloed op het type respons. De verhouding van de zogenaamde Th1/Th2 reactie nam toe in de volgorde:

geen adjuvans, Quil A, CT en CpG. Dit suggereert dat de immunogeniciteit, die opgewekt wordt door enkel difterie toxoid en die neigt naar een Th2 reactie, kan overgaan naar een Th1 reactie, afhankelijk van het gebruikte adjuvans. Hiermee kan de immunogeniciteit dus gemoduleerd worden.

In de literatuur staat beschreven dat elastische vesicles (deeltjes met een waterige kern omsloten door een hydrofobe laag van oppervlakte actieve stoffen) op een efficiënte manier medicijnen met een laag molecuulgewicht over de huid kunnen transporteren. In **Hoofdstuk 5** werd daarom een difterie toxoid bevattende vesiculaire formulering ontwikkeld en gekarakteriseerd. De vesicles bestaan uit uit sucrose-lauroat ester en natrium-bistridecyl sulfo-succinaat. Octa-oxyethyleen lauroat ester werd toegevoegd om de elasticiteit van de vesicles te verhogen. De variabelen voor de formuleringen waren de volgende: de verhouding van de verschillende bestanddelen, difterie toxoid concentratie, zuurtegraad (pH) en ionsterkte. De formuleringen werden geoptimaliseerd wat betreft de colloïdale stabiliteit en difterie toxoid-vesicle associatie. De pH had een dramatisch effect op de difterie toxoid-vesicle associatie. Bij pH 4.5 was meer dan 70% van het eiwit geassocieerd met de vesicles, terwijl minder dan 20% geassocieerd was bij pH 5.0. Hydrofobe interacties speelden een belangrijke rol bij deze associatie en de structurele integriteit van difterie toxoid bleef behouden tijdens de bereiding van de formulering. Omdat elastische vesicles voor laag moleculaire farmaca alleen efficiënt het transport door de huidbarriere verhogen indien de farmaca geassocieerd zijn met de vesicles, werd besloten om de formulering met een pH van 4.5 te selecteren voor in vivo studies.

Hoofdstuk 6 beschrijft een benadering, waarbij de voorbehandeling van micronealden werd gecombineerd met vesiculaire formuleringen, die het antigeen bevatten. Dermale vaccinatie van muizen werd uitgevoerd d.m.v. het occlusief (geen verdamping van water mogelijk) of niet-occlusief (wel verdamping van water) aanbrengen van de formulering op de intacte of op de met micronealden voorbehandelde huid. Uit de resultaten bleek dat difterie toxoid in vesicles niet tot een verbeterde immunogeniciteit leidde ten opzichte van vrij difterie toxoid. In de daaropvolgende studies bleek dat difterie toxoid de elasticiteit van de vesicles sterk verminderde. Dit verlies in elasticiteit en de snelle afgifte van difterie toxoid uit de vesicles bij pH 7.4 (de pH in de huid) zouden de oorzaak kunnen zijn voor de relatief lage immunogeniciteit. Daarom werden er positief geladen liposoom (vesicles bestaande uit voornamelijk fosfolipiden) formuleringen ontwikkeld, waarbij difterie toxoid

(negatief geladen) nog steeds met de liposomen geassocieerd is bij een pH van 7.4. De fysisch-chemische en de colloïdale eigenschappen, van de liposomen werden onderzocht en geoptimaliseerd, zoals dit ook was uitgevoerd voor de difterie toxoid-vesicles. Bij pH 7.4 bleek dat difterie toxoid voornamelijk geassocieerd was met de liposomen dankzij de elektrostatistische interacties. Toevoeging van Span 80 verhoogde de elasticiteit van de liposomen in de aanwezigheid van difterie toxoid terwijl de associatie van difterie toxoid met de liposomen intact bleef. Echter uit de daaropvolgende dermale vaccinatie studie bleek dat difterie toxoid geformuleerd in positief geladen vesicles ook niet tot een verhoogde immunigeniteit leidde ten opzichte van vrij difterie toxoid. Dit gold voor zowel de intacte als met micronealden voorbehandelde huid. Uit vervolgstudies bleek dat liposomen geen immuunstimulerende eigenschappen vertoonden wanneer ze werden toegevoegd aan DCs in vitro. Mogelijk is een verminderd transport over de huid de oorzaak van de lagere immunogeniciteit na dermale vaccinatie ten opzichte van vrij difterie toxoid, waarbij liposomen op zich niet de immunogeniciteit verhogen. Het inbouwen van adjuvantia in liposomen kan daar in de toekomst mogelijk verandering in brengen.

Uit het beschreven onderzoek blijkt dat de toepassing van vrij antigeen (difterie toxoid en het influenza antigeen) en difterie toxoid-bevattende vesiculaire formuleringen op intacte huid geen immuunrespons veroorzaakt. Dermale vaccinatie met het influenza antigeen is efficiënter door toevoeging van CT, onafhankelijk van voorbehandeling met micronealden. Wat betreft difterie toxoid, is voorbehandeling met micronealden efficiënt. De immunogeniciteit kan verder verhoogd worden door gebruik van adjuvantia. difterie toxoid associatie met vesicles blijkt minder efficiënt te zijn om de immunogeniciteit te verhogen. Dit geldt voor zowel onbehandelde huid als micronealden behandelde huid. De sterkte en de kwaliteit van de afweerreactie na dermale toediening kan verder worden geoptimaliseerd door het gebruik van adjuvantia.