



Universiteit
Leiden
The Netherlands

PLGA-based particulate vaccine delivery systems for immunotherapy of cancer

Monteiro Garrido Castro e Silva, Ana Luisa

Citation

Monteiro Garrido Castro e Silva, A. L. (2015, December 22). *PLGA-based particulate vaccine delivery systems for immunotherapy of cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/37169>

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/1887/37169>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37169> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Monteiro Garrido Castro e Silva, Ana Luisa (Ana Luisa Silva)

Title: PLGA-based particulate vaccine delivery systems for immunotherapy of cancer

Issue Date: 2015-12-22

Chapter 9

Appendix

Nederlandse Samenvatting
List of Abbreviations
List of Publications
Curriculum Vitae

Nederlandse Samenvatting

In de laatste jaren is er een toenemende interesse in therapeutische vaccinatie als behandelingsmethode tegen ziektes zoals kanker [1]. In het bijzonder zijn synthetische lange peptiden (SLPs) bestudeerd als goed gedefinieerde antigenen voor kanker-immunotherapie. Tot dusver zijn in (pre-)klinische studies SLPs geformuleerd in Montanide ISA 51, een water-in-olie (w/o) emulsie. Het gebruik van Montanide heeft echter belangrijke beperkingen, zoals een suboptimale effectiviteit en bijwerkingen. Er is dus een grote behoefte aan alternatieve formuleringen voor SLP-vaccins tegen kanker.

Het domein van kanker-immunotherapie, de huidige status van peptidevaccins tegen kanker, hun gebrek aan voldoende effectiviteit en de behoefte aan nieuwe adjuvantia worden geïntroduceerd in Hoofdstuk 1. In het bijzonder zijn biologisch afbreekbare afgiftesystemen op basis van een polymeer van melk- en glycolzuur (poly(lactic-co-glycolic acid; PLGA)) interessant omdat ze biologisch compatibel zijn; vrije antigenen na toediening kunnen beschermen tegen afbraak en snelle uitscheiding; co-inkapseling van (meerdere) antigenen en adjuvantia toelaten; en de grootte en structuur van een pathogeen imiteren. Bovendien worden ze efficiënter opgenomen door dendritische cellen (DCs) dan vrije antigenen [2, 3].

In Hoofdstuk 2 wordt een gedetailleerd overzicht gegeven van het gebruik van PLGA-deeltjes voor de afgifte van eiwit- en peptidevaccins. Dit hoofdstuk bespreekt de formuleringsparameters die de adjuvantiteit van deze systemen beïnvloeden, zoals grootte (nanodeeltjes (NDs) versus microdeeltjes (MDs)), lading, antigeenlokalisatie, afgifteprofiel, en het includeren van immuunmodulatoren, zoals Toll-like receptor ligands (TLRLs), en/of moleculen met specifieke sturing, zoals antilichamen. Verder schetst dit hoofdstuk hoe de formuleringsparameters opname, verwerking en presentatie van antigenen door DCs en de daarop volgende immuunrespons beïnvloeden. Dit hoofdstuk geeft ook een samenvatting van PLGA-formuleringen die in de literatuur bestudeerd zijn voor de afgifte van synthetische peptidevaccins.

Het voornaamste doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was het bestuderen hoe PLGA-deeltjes kunnen dienen als adjuvans in peptidevaccins tegen kanker, als een veiliger en effectiever alternatief voor Montanide. De belangrijkste doelstellingen van dit onderzoek waren:

- Het bepalen van de beste grootte van PLGA-deeltjes voor subcutaan toegediende vaccins;
- Ontwikkeling van PLGA-ND-formuleringen die beladen zijn met SLPs;
- Ontwikkeling van PLGA-NDs formuleringen, waarbij zowel SLPs als TLRLs in de deeltjes ingebouwd worden

Het eerste doel werd bereikt in Hoofdstuk 3, waarin de rol van de deeltjesgrootte bij het opwekken van een immuunrespons werd bestudeerd. Hiervoor voerden we een vergelijkende studie uit tussen NDs en MDs die equivalente hoeveelheden van het modelantigeen ovalbumine (OVA), en een TLRL, poly(I:C), met vergelijkbare afgiftekinetiek bevatten. We bestudeerden hoe de mate van internalisering door DCs de MHC-I klasse antigeenpresentatie *in vitro* beïnvloedt, en de daaropvolgende immuunrespons *in vivo*, vergeleken met afgifte van een lokaal subcutaan depot. Hiertoe werd enerzijds PLGA geformuleerd als NDs die efficiënt door DCs geïnternaliseerd konden worden, waarbij intracellulaire depots gevormd worden. Anderzijds werd PLGA verwerkt tot MDs die te groot ($> 20 \mu\text{m}$) zijn om opgenomen te worden, om zo enkel te functioneren als een extracellulair depot, vergelijkbaar met Montanide. We toonden aan dat efficiënte opname van deeltjes cruciaal is om een immuunrespons op te wekken. NDs werden efficiënt opgenomen door DCs na *in vitro* incubatie, terwijl dit bij MDs niet gebeurde. Dit resulteerde bij het gebruik van NDs, in tegenstelling tot MDs, in verhoogde MHC-I klasse antigeenpresentatie *in vitro*. Bovendien werd bij subcutane vaccinatie bij muizen een significant groter aantal antigeenspecifieke CD8⁺ T-cellen verkregen met NDs in vergelijking met MDs of OVA geëmulgeerd in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Bovendien leidde de ND-formulering tot een betere antilichaamrespons in vergelijking met de MD-formulering. Bovendien induceerde de ND-formulering een meer evenwichtige TH1/TH2-type antilichaamrespons dan de IFA-formulering. We concludeerden dat vaccins geformuleerd zouden moeten worden in nanodeeltjes ter bewerkstelling van efficiënte opname en significante MHC-I klasse cross-presentatie van het antigeen, maar ook voor effectieve T- en B-celresponsen.

Na het bepalen van de optimale grootte van PLGA-deeltjes voor eiwitvaccins, beschrijven we in Hoofdstuk 4 de toepassing van deze PLGA-NDs als afgiftesysteem voor het beladen van DCs *ex vivo*, om antigeen-specifieke CD8⁺ T-cellen te stimuleren om gebruikt te worden voor adoptieve T-celimmunotherapie. Daarvoor werden DCs, die voorheen geïncubeerd werden met PLGA-NDs met daarin ingekapseld het modelantigeen OVA of met het vrije eiwit geformuleerd in fysiologische zoutoplossing, gebruikt om CD8⁺ T-cellen te stimuleren, die vervolgens werden toegediend aan muizen. DCs geïncubeerd met PLGA-NDs stimuleerden cytotoxische T-lymfocyten (CTLs) *ex vivo* efficiënter dan niet verpakt eiwit. Bovendien leidde het toedienen van CTLs gestimuleerd met PLGA-NDs beladen DCs tot een betere lyse van de doelcellen *in vivo* en een efficiëntere tumorcontrole, waardoor muizen met agressieve tumoren langer konden overleven. Met deze studie is aangetoond dat de effectiviteit van eiwitantigenen voor vaccinatie tegen kanker verbeterd kan worden door ze te verpakken in PLGA-NDs.

Aangezien uit bovenstaande studie gebleken was dat de afgifte van eiwitantigeen via inkapseling in PLGA-NDs een efficiënte manier is om krachtige anti-tumor T-cellen te induceren, bestudeerden we in Hoofdstuk 5 de toepassing van inkapseling van SLPs in PLGA-NDs, om zo het tweede doel te bereiken. Met gebruikmaking van het modelantigeen OVA₂₄, een 24-residu lang synthetisch peptide met daarin een CTL-epitoom van OVA (SIINFEKL), was ons doel de formuleringsparameters te bepalen die nodig zijn om een SLP succesvol in PLGA-NDs in te kapselen. Daarnaast werden PLGA-NDs geoptimaliseerd wat betreft de SLP-inkapseling en -afgiftekinetiek, om

daarmee de efficiëntie van SLP cross-presentatie door DCs te verbeteren. Wanneer de standaard inkapselingstechnieken gebruikt werden (een dubbele emulsie, waarbij het oplosmiddel wordt verdampt), was de inkapseling erg laag (< 30%), of de directe afgifte (burst release) erg hoog (> 70%). Door de formulerings- en procesparameters aan te passen, ontdekten we dat de pH van de eerste emulsie van kritiek belang is voor efficiënte inkapseling en constante afgifte. Door in de binnenste fase een alkalische, in plaats van een zure, omgeving te creëren, waren we in staat om niet alleen de inkapseling van het SLP te optimaliseren, maar ook de burst release te reduceren, waarbij uiteindelijk stabiele NDs van ongeveer 330 nm werden verkregen met een inkapselingsefficiëntie van ongeveer 40% en een burst release van minder dan 10%. Inkapseling van OVA24 in deze PLGA-NDs gaf sterkere MHC-I klasse gemedieerde T-celactivatie *in vitro* ten opzichte van NDs met een hoge burst release en vrij (niet verpakt) OVA24. Dit toont aan dat een lage burst release van belang is voor het opwekken van een krachtige cellulaire immuunrespons. Deze inkapselingsmethode kan een veelbelovende aanpak zijn voor het formuleren van peptiden met amfifiele en/of hydrofiele eigenschappen, en is ook succesvol toegepast op andere SLPs. Deze studie onderschrijft het belang van het optimaliseren van het inkapselingsproces bij het ontwikkelen van een effectief en stabiel vaccinafgiftesysteem, en kan gezien worden als een basis voor de ontwikkeling van ND-formuleringen met SLPs voor kanker-immunotherapie.

Vervolgens werd de derde doelstelling onderzocht in Hoofdstuk 6, waarbij de inkapseling van een SLP (OVA24) samen met een TLRL (Pam3CSK4) in PLGA-NDs wordt beschreven. De verkregen formuleringen werden gebruikt om de intracellulaire mechanismen te karakteriseren waarmee DCs PLGA-NDs verwerken, en om de immunologische effecten van de combinatie van SLPs met een adjuvans te onderzoeken. We toonden aan dat TLR2-stimulatie de MHC-I klasse presentatie van SLPs door DCs *in vitro* versterkte. DCs die geïncubeerd werden met PLGA-SLP/(TLR2L)-NDs internaliseerden de NDs in endolysosomale compartimenten, wat zorgde voor een verlengde MHC-I klasse presentatie. PLGA-SLP-NDs en met name PLGA-SLP/TLR2L-NDs wekten constante CD8⁺ T-celproliferatie *in vivo* op na adoptieve transfer van PLGA-SLP/(TLR2L)-ND-beladen DCs. Deze bevindingen tonen aan dat de CD8⁺ T-celrespons versterkt wordt wanneer het antigeen langdurig cross-gepresenteerd is in MHC-I klasse moleculen, en dat mede-inkapseling van een TLRL deze effecten verder versterkt.

Ten slotte onderzochten we in Hoofdstuk 7 het vermogen van PLGA-NDs en kationische liposomen als afgiftesystemen voor SLP-vaccins voor het opwekken van T-celgemedieerde immuniteit. Daarvoor bestudeerden we de inkapseling van twee SLPs die een CTL- en een Th-epitoot (respectievelijk OVA24 en OVA17) van OVA bevatten, samen met TLRLs PAM3CSK3 en/of poly(I:C) in één deeltje, in een directe vergelijking met twee klinisch gebruikte adjuvantia, Montanide (een water-in-olie emulsie) en een op squaleen gebaseerde (olie-in-water emulsie) analoog aan MF59. De verkregen formuleringen werden *in vitro* en *in vivo* beoordeeld op hun capaciteit om CD8⁺ en CD4⁺ T-celimmunresponsen op te wekken. De liposomale en PLGA-ND-formuleringen waren in staat de antigeenopname door DCs en de daaropvolgende activatie van T-cellen *in vitro* te versterken. Subcutane vaccinatie van muizen toonde aan dat de efficiëntie van met SLP beladen liposomen en PLGA-NDs om functionele

antigeen-specifieke T-cellen in vivo op te wekken minstens zo goed (PLGA NDs) of beter (kationische liposomen) was dan SLPs geformuleerd in de emulsies. Hierbij waren liposomen het beste in staat om T-cellen te induceren met de hoogste capaciteit om overgebrachte doelcellen in muizen te doden. Uit deze bevindingen blijkt dat dat beide systemen, kationische liposomen en PLGA-NDs, veelbelovende afgiftesystemen zijn voor de klinische toepassing van SLP-vaccins voor kanker-immunotherapie.