



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Intradermal delivery of nanoparticulate vaccines using coated and hollow microneedles

Du, G.

Citation

Du, G. (2018, October 30). *Intradermal delivery of nanoparticulate vaccines using coated and hollow microneedles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66514>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66514>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66514> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Du, G.

Title: Intradermal delivery of nanoparticulate vaccines using coated and hollow microneedles

Issue Date: 2018-10-30

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Gedurende de laatste twee decennia is veel onderzoek verricht naar micronaalden met als voornaamste toepassing intradermale vaccinatie. Dit zijn, zoals de naam al doet vermoeden, naaldachtige structuren met een lengte van minder dan 1 mm. De micronaalden kunnen worden gebruikt om het stratum corneum (de opperhuid), de bovenste laag en de belangrijkste barrière van de huid, effectief te doorboren, waardoor het eenvoudiger is om vaccins via de huid toe te dienen [1, 2]. Aangezien micronaalden zo kort zijn dat ze geen zenuwen en bloedvaten bereiken, is de toediening van micronaalden minimaal invasief en pijnvrij. Dit beperkt de stress voor gevaccineerden en kan zo bijdragen aan een hogere vaccinatiegraad. Bovendien kan intradermale toediening van vaccins door middel van micronaalden de effectiviteit van vaccinatie verbeteren, omdat de huid een hoge concentratie aan antigeen presenterende cellen (APC's) bevat, zoals epidermale Langerhanscellen en dermale dendritische cellen [3].

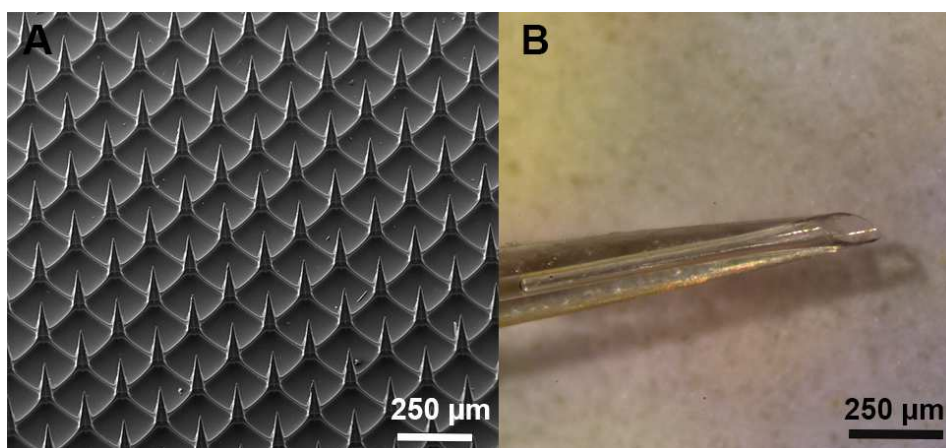
Verskillende soorten micronaalden zijn ontwikkeld voor de toediening van vaccins. Aanvankelijk werden massieve micronaalden gebruikt om de huid te doorboren, waarna na verwijdering van de micronaalden vaccinformuleringen op de huid werden aangebracht [4]. Een belangrijk nadeel van deze methode is dat slechts een klein deel van het vaccin in de huid terechtkomt, aangezien de diffusie door de aangebrachte gaatjes beperkt is vanwege de kleine diameter daarvan. Om dit probleem te omzeilen worden nu gecoate, oplosbare en holle micronaalden ontwikkeld. Gecoate micronaalden worden gemaakt uit massieve micronaaldenarrays, waarbij het oppervlak van de micronaalden bedekt is met het antigeen (de “werkzame stof” in een vaccin). Nadat de micronaalden in de huid ingebracht zijn, wordt de coating in de huid afgegeven. Oplosbare micronaalden zijn gemaakt van oplosbare polymeren, biologisch afbreekbare polymeren of suikers. Het antigeen wordt in de matrix van micronaalden geladen. Na het inbrengen van micronaalden in de huid begint de matrix op te lossen of af te breken, waardoor het antigeen vrijkomt. Holle micronaalden bevatten een kanaal waardoor de vaccinformulering in de huid kan worden geïnjecteerd. Een overzicht van de bereidingsmethoden voor deze verschillende soorten micronaaldjes is uitgebreid besproken in de literatuur [1-3, 5].

Op nanodeeltjes gebaseerde vaccins (hieronder nanodeeltjes-vaccins genoemd) bevatten nanodeeltjes met een diameter kleiner dan 1000 nm die beladen zijn met antigeen [6]. Nanodeeltjes zijn in staat om het antigeen te beschermen tegen afbraak en de opname van antigeen door APC's te vergroten. Bovendien is het mogelijk door middel van nanodeeltjes het antigeen en adjuvans (een hulpstof ter bevordering van de immunrespons) gezamenlijk toe te dienen. Dit zou de immunrespons kunnen verbeteren [7, 8]. Daarnaast kan de immunrespons worden gemodificeerd of versterkt door de fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes te optimaliseren, zoals grootte en oppervlaktelading van de deeltjes alsmede de afgiftekinetiek van antigeen en adjuvans [9, 10]. Verschillende soorten nanodeeltjes zijn onderzocht als antigeen-afgiftesystemen, zoals o.a. polymere nanodeeltjes, liposomen en anorganische nanodeeltjes [6].

Tegenwoordig wordt steeds meer onderzoek verricht naar het gebruik van micronaalden voor intradermale toediening van nanodeeltjes-vaccins. Dit heeft als doel om de voordelen van micronaalden en nanodeeltjes te combineren. Uit een eerdere studie is gebleken dat micronaalden gecoat met antigeen beladen nanodeeltjes bestaande uit lipiden leidden tot een hogere IgG2a respons dan micronaalden met alleen het antigeen [11]. Uit andere studies bleek

dat oplosbare micronealden beladen met antigeen bevattende PLGA-nanodeeltjes leidde tot hogere Th1 en CD8⁺ T-celresponsen in vergelijking met een oplossing van vrij antigeen [12, 13]. Tevens bleek dat met holle micronealden geïnjecteerde tetanustoxoïde beladen chitosan-nanodeeltjes een hogere IgG2a-respons en hogere expressie van Th1-cytokines leidden dan een commercieel tetanustoxoïdevaccin [14]. Uit deze onderzoeken blijkt dat het gebruik van micronealden voor intradermale toediening van nanodeeltjes-vaccins voordelen kan bieden.

Gebaseerd op deze bevindingen is het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift om 1) micronealden te gebruiken en te optimaliseren om intradermaal nanodeeltjes-vaccins toe te dienen en 2) te onderzoeken of de fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes-vaccins de immuunrespons tegen het antigeen beïnvloeden na intradermale toediening met micronealden. In het onderzoek beschreven in dit proefschrift hebben we ons gericht op het gebruik van gecoate en holle micronealden. Gecoate micronealden waren gebaseerd op microneaald-arrays gemaakt van silicium waarbij het oppervlakte gemodificeerd was met pyridinegroepen, waardoor de lading van het oppervlakte pH-gevoelig was. Deze micronealden zijn in staat om negatief geladen antigenen te binden in een zure omgeving en de coating af te geven bij neutrale pH zoals aanwezig in de huid [15, 16]. In het geval van holle micronealden werden de micronealden gemaakt uit silica capillairen die geëtsd werden met fluorwaterstofzuur [17]. Deze micronealden kunnen worden gebruikt om vloeibare formuleringen intradermaal in de huid te injecteren. Microscopische afbeeldingen van een micronealdenarray en een holle microneaald zijn weergegeven in **Fig. 1**.



Figuur 1. Microscopische opnamen van micronealden. A: scanning electron microscopische afbeelding van een pH-gevoelige micronealdenarray, B: microscopische opname van een holle microneaald.

Samenvatting van de resultaten

In hoofdstuk 1 wordt een korte inleiding gegeven over het gebruik van micronealden en nanodeeltjes voor vaccintoediening via de huid.

In hoofdstuk 2 wordt een nieuw type mesoporeuze silica-nanodeeltjes (MSN's) met grote poriën geïntroduceerd. Deze silica-nanodeeltjes werden beladen met ovalbumine (OVA). De maximale beladingscapaciteit was ongeveer 34%. De colloïdale stabiliteit van de MSN's werd verhoogd door het oppervlak van de MSN's te bekleden met een negatief geladen lipidenmembraan (LB-MSN-OVA). Vervolgens werd onderzocht of de MSN's de antigeenopname door dendritische cellen verbeterde. Daartoe werd de opname van LB-MSN-

OVA door dendritische cellen onderzocht en vergeleken met die van een OVA-oplossing. Inderdaad leidde het gebruik van LB-MSN-OVA tot een hogere opname in dendritische cellen dan OVA-oplossing. Vervolgens werden met pyridine gemodificeerde microneaaldenarrays gecoat met LB-MSN-OVA. Het coatingproces vond plaats onder zure omstandigheden (pH 5,8). Het coatingsproces was gebaseerd op de elektrostatische interactie tussen het positief geladen microneaaldenoppervlak en de negatief geladen nanodeeltjes. Uit scanning-elektronenmicroscopie (SEM) en confocale laser-scanningmicroscopie (CLSM) opnamen bleek dat LB-MSN-OVA met succes op het oppervlak van de microneaalden werd gecoat. In totaal kon 1,5 µg OVA in LB-MSN-OVA gecoat worden op één microneaaldenarray. Tenslotte bleek uit afgiftestudies dat de gecoate microneaaldenarrays na penetratie in de menselijke ex-vivo huid de LB-MSN-OVA afgaven.

De studies beschreven in Hoofdstuk 3 zijn uitgevoerd met een ander type nanodeeltje, namelijk poly(melkzuur-co-glycolzuur) (PLGA-)nanodeeltjes. OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes werden gemaakt met een positieve of negatieve oppervlaktelading en PLGA-nanodeeltjes die zowel OVA als poly(I:C), een adjuvans, bevatten. Het effect van inkapseling van OVA met of zonder poly(I:C) in PLGA nanodeeltjes op T-celresponsen werd onderzocht. Hiertoe werden de formuleringen met een holle microneaald intradermaal geïnjecteerd in muizen. Er werden verschillende experimenten uitgevoerd. Ten eerste werd onderzocht of OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes tot een hogere T-celrespons leidden dan een OVA-oplossing. Het bleek dat OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes met een positieve of negatieve oppervlaktelading tot een vergelijkbare verhoging van het aantal OVA-specifieke (niet endogene) CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen leidden. Het aantal T-cellen was aanzienlijk hoger dan geïnduceerd door een OVA oplossing. Omdat dit een heel positief resultaat was, werd in een tweede stap uitgezocht of OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes met en zonder poly(I:C) ook leiden tot een verhoging van endogene T-cellen. Toediening van OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes (met een positieve of negatieve oppervlakte lading) en PLGA-nanodeeltjes die zowel OVA als poly (I: C) bevatten leidde tot een verhoging van het aantal endogene OVA-specifieke CD8⁺ T-cellen. Poly(I:C) in de formulering (hetzij gemengd met OVA-oplossing hetzij met OVA ingebouwd in de PLGA-nanodeeltjes) verhoogde de CD8⁺ T-celresponsen. Bovendien bleek dat OVA-bevattende PLGA-nanodeeltjes met een positieve oppervlaktelading een sterkere endogene CD8⁺ T-celrespons opwekten dan OVA bevattende PLGA-nanodeeltjes met een negatieve oppervlakte lading. Ten slotte werd onderzocht of de opgewekte endogene T-celresponsen ook in staat waren de muizen te beschermen tegen een infectie met de intracellulaire bacterie *Listeria monocytogenes*. Het bleek dat OVA en poly(I:C) bevattende PLGA-nanodeeltjes leiden tot een volledige bescherming tegen de bacterie. Samengevat, uit deze studie blijkt dat PLGA-nanodeeltjes uitstekende formuleringen zijn voor de intradermale toediening van een eiwitantigeen, en dat deze formulering resulteert in een beschermende cellulaire immuunrespons.

Uit de resultaten beschreven in hoofdstuk 2 en 3 blijkt dat antigeen bevattende nanodeeltjes de immuunrespons drastisch kunnen verbeteren. Daarom is het interessant om de effectiviteit van verschillen typen OVA bevattende nanodeeltjes met elkaar te vergelijken. Dit onderzoek wordt beschreven in Hoofdstuk 4. In dit hoofdstuk werden verschillende OVA bevattende nanodeeltjes met of zonder adjuvans, poly(I:C), met elkaar vergeleken. Holle microneaalden werden weer gebruikt om de formuleringen intradermaal toe te dienen. OVA en poly(I:C) bevattende negatief geladen PLGA-nanodeeltjes, positief geladen liposomen, negatief geladen MSN's en positief geladen gelatine-nanodeeltjes (GNP's) werden met elkaar vergeleken. De nanodeeltjes verschilden verder in gemiddelde grootte en in afgifteprofiel. PLGA-nanodeeltjes en liposomen hadden een gemiddelde deeltjesgrootte van ongeveer 150 nm.

Tevens was de afgiftesnelheid van OVA en poly(I:C) laag. De deeltjesgrootte van MSN's en GNP's was tussen de 500-700 nm en de afgiftesnelheid van OVA en poly(I:C) was veel sneller. Uit immunisatiestudies in muizen bleek dat OVA bevattende nanodeeltjes en OVA en poly(I:C) bevattende nanodeeltjes in vergelijking met OVA en poly(I:C) in een buffer oplossing tot vergelijkbare IgG- en IgG1-responsen leidden. Echter er was wel een belangrijk verschil in IgG2a-responsen in vergelijking met een OVA / poly(I:C) oplossing. Het type nanodeeltje had invloed op de hoogte van de IgG2a respons: Negatief geladen PLGA-nanodeeltjes en positief geladen liposomen veroorzaakten hogere IgG2a-responsen dan de negatief geladen MSN's en de positief geladen GNP's. Dit geeft aan dat een kleine nanodeeltjesgrootte en/of een langzame afgifte van antigeen en adjuvans leidt tot een hogere IgG2a-respons. Omdat IgG2a vaak gerelateerd is aan cellulaire responsen, werd besloten ook deze te onderzoeken. Het bleek dat OVA en poly(I:C) bevattende positief geladen liposomen de sterkste verhoging van het aantal CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen teweegbrachten en dus superieur zijn ten opzichte van de andere onderzochte deeltjes. Ook blijkt uit deze studies dat de in eigen huis ontwikkelde holle micronealden met applicator uitstekend gebruikt kunnen worden voor het screenen van verschillende vaccinformuleringen.

De volgende vraag in het onderzoek was of het cruciaal is om antigeen en adjuvans beiden in dezelfde nanodeeltjes te verpakken, of dat ze ieder apart in de nanodeeltjes verpakt kunnen worden met behoud van de immunogeniciteit. De studies om deze vraag te beantwoorden zijn beschreven in hoofdstuk 5. In dit onderzoek werd hetzelfde type positief geladen liposomen gebruikt, waarin DT en poly(I:C) ofwel samen in dezelfde liposomen (DT/poly(I:C)-liposomen) of afzonderlijk in de liposomen (DT-liposomen en poly(I:C)-liposomen) ingebouwd werden. Intradermale vaccinatie werd uitgevoerd met de holle micronealden met de volgende formuleringen: i) DT in buffer, ii) DT gemengd met poly(I:C) in buffer, iii) DT-liposomen, iv) een mengsel van DT-liposomen en poly(I:C)-liposomen en v) DT/poly(I:C)-liposomen. De antigeen- en adjuvans-bevattende liposomen wekten sterke responsen op, waarbij de IgG2a-respons hoger was in vergelijking met DT in buffer, ongeacht of DT en poly(I:C) individueel of beiden in dezelfde liposomen waren geïncorporeerd. Deze resultaten laten zien dat een intradermaal toegediende formulering met een mengsel van DT-liposomen en poly(I:C)-liposomen even immunogeen is als een formulering met DT/poly(I:C)-liposomen.

In Hoofdstuk 6 worden studies beschreven waarin met een fosfolipidenmembraan omhulde MSN's waarin DT is geïncorporeerd (LB-MSN-DT) zijn gecoat op pH-gevoelige micronealdenarrays. Met dezelfde bereidingsmethode als beschreven voor OVA in hoofdstuk 2, werd DT geïncorporeerd in MSN's. Vervolgens werd een negatief geladen fosfolipidenmembraan op het oppervlak van de MSN's aangebracht. De nanodeeltjes hadden een hoge beladingscapaciteit van DT, namelijk ongeveer 20%. De negatief geladen LB-MSN-DT nanodeeltjes en het positief geladen N-trimethylchitosan (TMC) werden afwisselend gecoat op het pH-gevoelige oppervlak van de met pyridine gemodificeerde micronealdenarrays. Uit SEM- en CLSM-afbeeldingen bleek dat de nanodeeltjes met succes op het oppervlak van de micronealden waren gecoat. De cumulatieve gecoate hoeveelheid DT in LB-MSN-DT voor een 5-laagse en 3-laagse coating was respectievelijk ongeveer 1,9 µg en 1,1 µg DT, overeenkomend met ca. 9,7 µg en 5,7 µg LB-MSN-DT (uitgedrukt als het gewicht van MSN's). Uit een afgiftestudie in de ex vivo menselijke huid bleek dat 0,814 µg en 0,256 µg van de geïncorporeerde DT werd afgegeven aan de huid met respectievelijk een 5-laagse en 3-laagse gecoate micronealdenarray. Deze gecoate micronealden arrays werden vervolgens gebruikt voor een intradermale immunisatiestudie. De immuunrespons werd vergeleken met dezelfde dosis LB-MSN-DT toegediend via een holle microneald. LB-MSN-DT induceerde

sterkere antilichaamresponsen dan een DT-oplossing bij toediening via een holle microneaald, maar induceerde slechts een vergelijkbare respons als een DT-oplossing wanneer toegediend door gecoatte microneaalden. De resultaten van het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek laten zien dat zowel de incorporatie van het antigeen in een nanodeeltje als de keuze van het type microneaalden de immuunrespons tegen het antigeen kan beïnvloeden, en dat het gecoatte microneaaldsysteem mogelijk moet worden verbeterd om een optimale immuunrespons op te wekken.

Samengevat tonen de in dit proefschrift beschreven resultaten aan dat antigenen in nanodeeltjes intradermaal kunnen worden toegediend door gebruikmaking van gecoatte en holle microneaalden, waarmee vervolgens antigeen-specifieke antistof- en T-celresponsen opgewekt kunnen worden. De keuze van zowel de nanodeeltjes als de microneaald(en) kan een belangrijke invloed hebben op de effectiviteit van de vaccinatie. Microneaaldenarrays gecoat met antigeen-geladen MSN's zouden een veelbelovend systeem kunnen zijn voor gemakkelijke en snelle intradermale toediening van een eiwit antigeen, hoewel onze resultaten aangeven dat het systeem nog moet worden verbeterd om een optimale immuunrespons te verkrijgen. Bovendien kunnen met antigeen en adjuvans beladen nanodeeltjes IgG2a en vooral CD8⁺ T-celresponsen verhogen na intradermale toediening door een holle microneaald. Dit effect hangt af van de fysisch-chemische eigenschappen van de nanodeeltjes, waarbij bleek dat de kleinere nanodeeltjes en/of een langzame afgifte van het antigeen en adjuvans uit de deeltjes de respons versterken. Ten slotte kan, wanneer intradermaal toegediend via een holle microneaald, de combinatie van afzonderlijke met antigeen en adjuvans geladen nanodeeltjes even effectief zijn als een formulering met het antigeen en adjuvans samen geïncorporeerd in dezelfde nanodeeltjes.