



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nanoparticles and microfluidics for future tuberculosis vaccines

Neustrup, M.A.

Citation

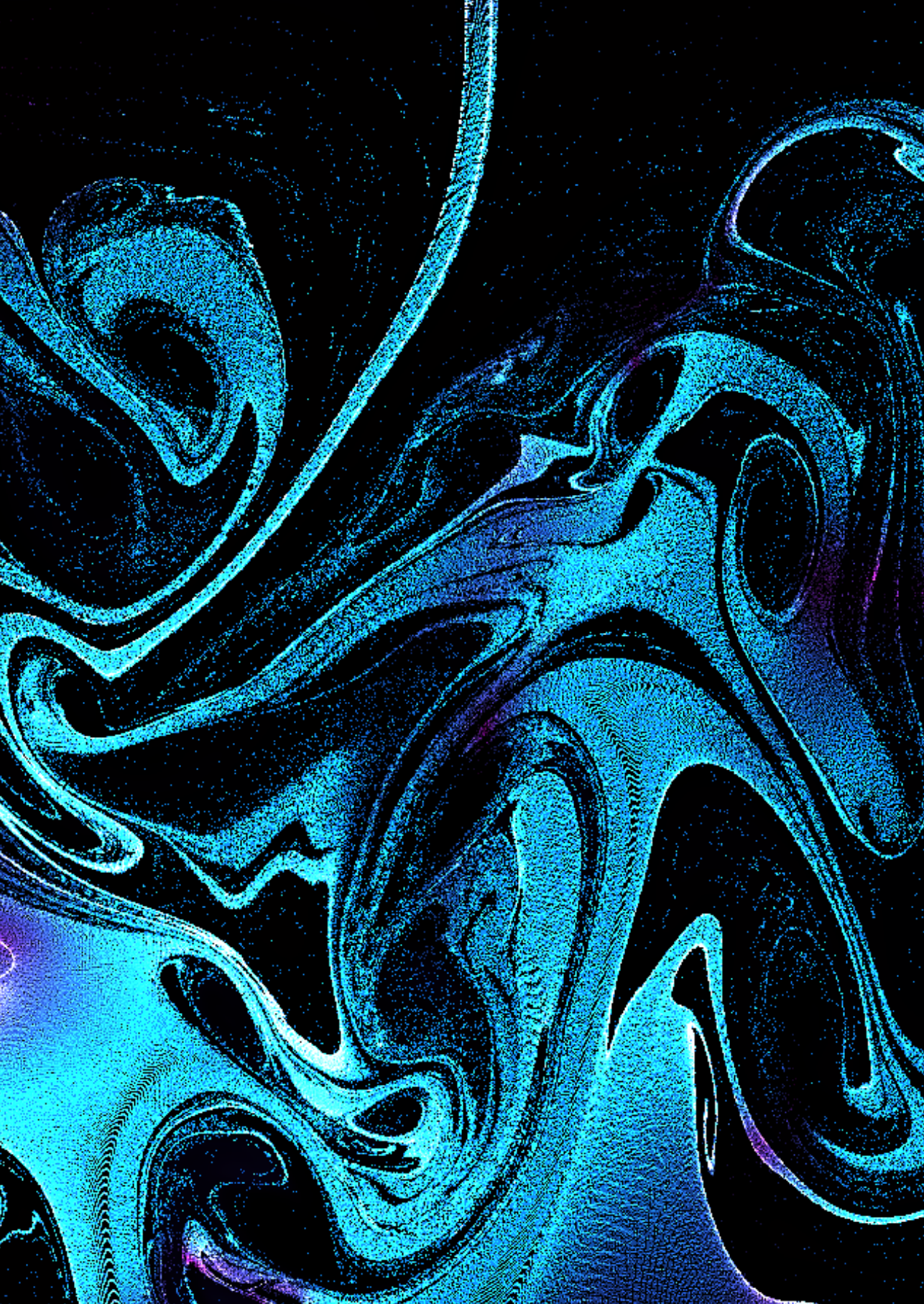
Neustrup, M. A. (2025, September 23). *Nanoparticles and microfluidics for future tuberculosis vaccines*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4261476>

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/1887/4261476>

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



APPENDICES

SAMENVATTING VAN HET PROEFSCHRIFT
CURRICULUM VITAE
LIST OF PUBLICATIONS
ABBREVIATION LIST

SAMENVATTING VAN HET PROEFSCHRIFT

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op nanoparticulaire vaccinformuleringen en toedieningsroutes om de antigen-specifieke inductie van pro-inflammatoire immuunreacties te verbeteren in de zoektocht naar nieuwe vaccinatiestrategieën om tuberculose (TB) te voorkomen.

Dit proefschrift behandelt verschillende aspecten betreffende de ontwikkeling van een nieuw TB-subunitvaccin. In **Hoofdstuk 1** wordt de TB-immunologie en de noodzaak van innovatieve vaccinoplossingen geïntroduceerd. Hierna wordt het doel van het onderzoek in dit proefschrift beschreven. Tenslotte wordt de opzet van het proefschrift besproken.

In **Hoofdstuk 2** zijn studies beschreven waarin het recombinante eiwit Ag85B-ESAT6-Rv2034 (AER) verpakt werd in positief geladen liposomale formuleringen met variërende lipidsamenstellingen. Vervolgens werden de immuunreacties van de formuleringen in vitro bepaald. De AER-bevattende liposomen werden geformuleerd met behulp van de dunne-filmlaag dehydratie-rehydratie methode, gevolgd door tip-sonicatie. De liposomen bestonden uit een positief geladen lipide, cholesterol en een helperlipide (zwitterion) in verschillende molaire verhoudingen. De fysicochemisch stabiele formuleringen werden vervolgens onderzocht met een reeks in vitro testen: i) een assay met humane monocyt-afgeleide dendritische cellen (MDDC), waarbij de levensvatbaarheid en activering van dendritische cellen (DC) werden beoordeeld na incubatie van die DCs met de formuleringen, ii) een assay waarbij de opname van liposomen werd gemeten in MDDC en M1 (klassiek geactiveerde macrofagen die een pro-ontstekings fenotype vertonen) en M2 (alternatief geactiveerde macrofagen die een anti-ontstekings fenotype vertonen) cellen, en iii) een T-cel assay waarin de best presterende formuleringen werden getest door de geactiveerde DCs te incuberen met T helpercellen, om te bepalen of bij de laatste de expressie van de activeringsmarker CD154 en hun interferon (IFN)- γ -productie verhoogd werden.

De formuleringen met cholesterol en de positief geladen lipiden 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propaanchloride (DOTAP), dimethyldioctadecylammoniumbromide (DDA), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine chloride (EPC) of N4-cholesteryl-spermine hydrochloride (GL-67) induceerden de hoogste upregulatie van de MDDC-activeringsmarkers CD40, CD80 en CCR7. De formulering met GL-67 induceerde echter een hoge celdood en werd daarom niet geselecteerd voor de T-celassay. Wat betreft de resterende formuleringen verhoogden de AER/DOTAP:cholesterol:1,2-dioleoyl-snglycero-3-phosphocholine (DOPC) en AER/EPC:cholesterol:DOPC formuleringen de productie van IFN γ en de expressie van CD154⁺ significant in T helpercellen vergeleken met hun AER-lege tegenhangers. Echter, in een afzonderlijke studie (ongepubliceerd) waren de DOTAP-liposomen minder in staat T celgemedieerde immuunreacties op te

wekken. Daarom werd alleen de lipideverhouding van de AER/EPC:cholesterol:DOPC-formulering verder geoptimaliseerd, waarbij een molaire lipidenverhouding van 2:1:2 de meest veelbelovende formulering was, omdat deze het DC-activeringsmarkers en cytokine/chemokineproductie het sterkst verhoogde. Samengevat, dit hoofdstuk beschrijft een screeningmethode voor vaccinformuleringen, waarbij de EPC:cholesterol:DOPC-formulering het sterkste T-helper type 1 responsen induceert en dus de meest belovende formulering is voor verdere ontwikkeling als TB vaccin.

In **Hoofdstuk 3** wordt een nieuw, kosteneffectief modulair microfluidisch systeem geïntroduceerd voor de productie van poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA)-nanodeeltjes. De eenvoudigste vorm van het modulaire microfluidische systeem omvat een co-flowconfiguratie, waarbij een binnen stroom van PLGA-bevattend organisch oplosmiddel een buitenste stroom van een waterige vloeistof ontmoet. Het mengen van deze twee oplosmiddelen veroorzaakt PLGA nanoprecipitatie, wat leidt tot de vorming van nanodeeltjes. Onderzocht werd hoe de stroomsnelheid, type oplosmiddel en de PLGA concentratie de vorming van nanodeeltjes beïnvloedt. De bruikbaarheid van dit systeem voor het maken van nanodeeltjes voor gecontroleerde geneesmiddelaafgifte werd onderzocht door positief en negatief geladen eiwitten (model geneesmiddelen) in PLGA-nanodeeltjes te incorporeren. Uit de experimentele resultaten bleek dat de vorming van nanodeeltjes wordt beïnvloed door de PLGA-concentratie, waarbij een toenemende PLGA-concentratie leidt tot grotere deeltjesdiameters. Verder bleek dat een verhoging van de totale stroomsnelheid resulteert in de vorming van kleinere nanodeeltjes. Het gebruik van ultrapuur water in de waterfase resulteerde in negatief geladen nanodeeltjes en ongecontroleerde precipitatie in het systeem bij hoge PLGA-concentraties. Ondertussen creëerde het toevoegen van poly(vinylalcohol) aan de waterfase neutrale deeltjes en elimineerde deze toevoeging de precipitatieproblemen. Negatief geladen deeltjes werden reproduceerbaar verkregen door gebruik te maken van ethanol-watermengsels. Incorporatie van de eiwitten ovalbumine of lysozyme (respectievelijk negatief en positief geladen) met een driefloeistofkanalsysteem resulteerde in encapsulatieefficiënties van boven de 40%. Hieruit kan geconcludeerd worden dat in dit onderzoek een goedkoop en gemakkelijk aanpasbaar modulair microfluidisch systeem werd ontwikkeld om PLGA-nanodeeltjes te bereiden met een controleerbare deeltjesdiameter. Ook maakt dit systeem het mogelijk om eiwitten in te bouwen, waardoor dit systeem veelbelovend is voor het maken van nanodeeltjes-gebaseerde geneesmiddel- en vaccintoepassingen.

In **Hoofdstuk 4** worden studies beschreven waarin drie verschillende nanodeeltjes worden vergeleken: kationische pH-gevoelige liposomen, bereid door middel van sonicatie, en twee nanodeeltjes bereid met het modulair-microfluidisch-systeem, namelijk PLGA-nanodeeltjes en PLGA-nanodeeltjes met aan de buitenkant een lipidenlaag (lipide-PLGA-hybriden).

De immunogeniciteit van de nanodeeltjes met het antigeen AER met en zonder de adjuvanten (een molecuul dat de immuunreactie kan verhogen of veranderen) monophosphoryl lipide A (MPLA) en cytosine-fosfaat-guanine-motieven oligodeoxynucleotiden (CpG ODN) 1826 werd in vitro in MDDCs (zoals beschreven in hoofdstuk 2) beoordeeld. Eerst werd de opname van de nanodeeltjes in MDDCs zonder de adjuvanten geëvalueerd. Lipide-PLGA-hybriden en pH-gevoelige liposomen werden efficiënt opgenomen door MDDCs, maar PLGA-nanodeeltjes niet. Daarna werden MDDCs gestimuleerd met de nanodeeltjes met en zonder de adjuvanten. De MDDCs werden onderzocht op activeringsmarkers en cytokineproductie. Bij de nanodeeltjes formuleringen zonder adjuvanten waren de kationische pH-gevoelige liposomen minder efficiënt dan de lipide-PLGA-hybriden in het upreguleren van dendritische cel-activeringsmarkers en cytokineproductie, terwijl PLGA-nanodeeltjes het minst efficiënt waren. PLGA-deeltjes en kationische pH-gevoelige liposomen zonder adjuvanten induceerden nauwelijks de secretie van cytokines/chemokines. De lipide-PLGA-hybriden, PLGA-nanodeeltjes en de pH-gevoelige liposomen met adjuvanten waren allemaal efficiënt in het up-reguleren van dendritische cel-opppervlaktemarkers en cytokineproductie.

De beschermende werkzaamheid van de liposomen, PLGA-nanodeeltjes en de lipide-PLGA-hybriden geformuleerd met de moleculaire adjuvanten werd in vivo getest in C57Bl/6-muizen die besmet werden met *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) om de mogelijke bescherming van het TB-vaccin te onderzoeken. De kandidaatvaccins die we ontwikkelden werden vergeleken met het huidige *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-vaccin en AER gemengd met de twee adjuvanten MPLA en CpG ODN 1826. Alle vaccins (BCG, liposomen, PLGA-nanodeeltjes en de lipide-PLGA-hybriden), behalve het AER- adjuvant mengsel induceerden bescherming tegen TB in C57BL/6 muizen. Dit bleek uit een significante vermindering van de bacteriële lading TB in de longen en milt van de dieren in vergelijking met de bacteriële lading niet-gevaccineerde muizen. Muizen gevaccineerd met PLGA-nanodeeltjes hadden een lager aantal Mtb-bacteriën in de milt en longen vergeleken met het BCG-vaccin en de twee vaccins gebaseerd op nanodeeltjes; het verschil was echter niet statistisch significant, omdat de groepen uit een klein aantal muizen bestonden. Samengevat, uit deze studies kan geconcludeerd worden dat nanodeeltjes-gebaseerde formuleringen de Mtb-bacteriële lading bij de muizen verlaagde. De PLGA-nanodeeltjes leidde tot de beste bescherming, hoewel de lipide-PLGA-hybriden iets betere resultaten in vitro lieten zien.

In **Hoofdstuk 5** worden studies beschreven waarin het effect van intradermale toediening van PLGA-nanodeeltjes met CpG ODN 1826 en ovalbumine in oplosbare microneedles (dMNAs) vergeleken werd met intradermale toediening met hypodermische (klassieke injectie) naalden in vivo. Intradermale injectie van nanodeeltjes is een effectieve toedieningsroute voor vaccins, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**.

In deze studie moesten we eerst stabiele dMNAs met daarin PLGA-nanodeeltjes ontwikkelen. Dit was belangrijk omdat de verschillende polymeren die werden gebruikt voor de bereiding van dMNAs de integriteit – en daarmee de functionaliteit – van de nanodeeltjes kan beïnvloeden. De dMNAs bereid met poly(vinylalcohol) vertoonden bijna geen aggregatie van PLGA-nanodeeltjes in de oplosbare dMNAs. De PLGA:poly(vinylalcohol)-gewichtsverhouding van 1:9 resulteerde in 100% huid-penetratie efficiëntie en de snelste oplosbaarheid in ex-vivo humane huid (de dMNAs losten op binnen 30 minuten). Vervolgens werden injecteerbare formuleringen en dMNAs beiden met ovalbumine en CpG ODN 1826 met en zonder PLGA-nanodeeltjes getest in muizen. De injecteerbare formuleringen met ovalbumine en CpG ODN 1826 met en zonder PLGA-nanodeeltjes induceerden significante T helpercelresponsen in muizen vergeleken met de andere formuleringen. De formulering met ovalbumine en CpG ODN 1826 met PLGA-nanodeeltjes induceerde significante cytotoxische T-celresponsen vergeleken met de andere formuleringen. Helaas losten de dMNAs niet volledig op in de muizenhuid, wat mogelijk de reden is waarom de toediening via dMNAs geen helper en cytotoxische T-cel responsen induceerden.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de injecteerbare formuleringen beter presteerden dan de dMNAs, waarschijnlijk vanwege de slechte oplosbaarheid van de dMNAs in muizenhuid in het in vivo experiment. De oplosbaarheid was echter goed in de ex-vivo humane huid, wat de verschillen tussen de modellen bloot legt. De dMNA-formulering moet in de toekomst daarom worden aangepast voor studies met muizen. Hoewel we geen immuun responsen induceerden met behulp van dMNAs, konden dMNAs met PLGA-nanodeeltjes met succes worden bereid, aangezien de deeltjes hun fysisch-chemische eigenschappen behielden na oplossen. De injecteerbare formulering met PLGA-nanodeeltjes bereid door middel van het modulaire microfluidische systeem was bijzonder krachtig in het induceren van helper en cytotoxische T-celresponsen.