Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/94658

File ID	94658
Filename	4.2 Summary and conclusion in Dutch

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Evaluation of adenoviral vectors as vaccine for malaria
Author	O.J.A.E. Ophorst
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2008
Pages	155
ISBN	9789081237710

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/263689

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

4.2 Summary and conclusion in Dutch

SAMENVATTING

Jaarlijks bezwijken 1-2 miljoen mensen, voornamelijk kinderen jonger dan vijf jaar aan de gevolgen van malaria. Ondanks alle pogingen om infectie en klinische symptomen te voorkomen is er tot op heden geen effectief vaccin tegen malaria ontwikkeld. Conventionele vaccins hebben vaak niet of nauwelijks effect waardoor er dringend vraag is naar innovatieve technieken die kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen de humane *Plasmodium falciparum* parasiet. Met de opkomst van de recombinant DNA technologie zijn er twee kandidaat dragers (vectoren), DNA en recombinanten virussen die potentieel interessant zijn voor vaccin ontwikkeling. In tegenstelling tot de conventionele vaccins, zijn deze vectoren in staat om sterke cellulaire immuunresponsen te induceren tegen het antigeen dat ze tot expressie brengen. Vanuit vaccin productie perspectief zijn vooral virale vectoren aantrekkelijk. Deze vaccins kunnen op grote schaal geproduceerd worden en hiermee voldoen aan de vraag van miljoenen dosissen die nodig zullen zijn voor grote vaccinatie campagnes. Dit laatste heeft ertoe geleid dat er door de jaren heen meer aandacht is uitgegaan naar de productie technologie van recombinant virale vectoren.
Uit preklinische studies is gebleken dat vooral recombinanten vectoren gebaseerd op humaan adenovirus serotype 5 (Ad5) in staat zijn om sterke cellulaire immuunreacties te induceren tegen tal van antigenen afkomstig van diverse ziekteverwekkers. Echter het gebruik van Ad5 vectoren voor vaccinatie doeleinden kan limiterend zijn. Dit geldt met name voor mensen die van nature hoge neutraliserende antilichaam titers hebben tegen het wildtype Ad5 virus. Dit is verder onderbouwd door preklinisch en klinisch onderzoek waarin is aangetoond dat de effectiviteit van een Ad5 vaccin afneemt in aanwezigheid van anti-Ad5 immuniteit. Verder is gebleken dat de infectie van antigeen presenterende cellen (APC) *in vitro* door rAd5 minimaal is. Met de wetenschap dat APCs een primaire rol spelen bij de inductie van immuniteit kan het ontbreken van een geschikt cel tropisme leiden tot suboptimale inductie van antigeen specifieke immuunresponsen.
Met als doel nieuwe potentiële adenovirale malaria vaccins te ontwikkelen voor klinisch gebruik, is het noodzakelijk meer inzicht te krijgen in de immuunresponsen die gericht zijn tegen de Ad5 vector. Daarnaast is het van belang om vast te stellen of antigeen specifieke immuunresponsen verder verhoogd kunnen worden wanneer adenovirale vectoren antigenen efficiënter overdragen aan APCs.
Ervan uitgaande dat adenovirus capside eiwitten (hexon, fiber, penton) beschikken over B-cel epitopen die een belangrijke rol spelen in anti-vector immuniteit en het feit dat een fiber eiwit doorgaans het cel tropisme bepaald, zijn er chimere Ad5 vectoren gegenereerd waarbij het fiber eiwit vervangen is. Hierbij is gekozen voor het fiber eiwit van humaan adenovirus serotype 35 (Ad5Fib35). Deze chimere rAd5Fib35 vectoren zijn in staat om humane dendritische cellen (DC), gedifferentieerd vanuit monocyten efficiënter te transduceren dan de gebruikelijke Ad5 vectoren. Hier opvolgend is het Ad5Fib35 infectie patroon van APC in relatie tot de inductie van immuunresponsen *in vitro* en *in vivo* bestudeerd en tenslotte het vermogen van rAd5Fib35 om anti-Ad5 immuniteit te omzeilen (hoofdstuk 2.1). Enkele belangrijke conclusies die voortkomen uit deze studies zijn (*i*) dat het uitwisselen van een fiber eiwit niet voldoende is om anti-Ad5 immuniteit te omzeilen in zowel muis als in primaten (*ii*) dat er geen verschillen in antigeen specifieke immuunresponsen zijn waargenomen na vaccinatie met rAd5 of rAd5Fib35, ondanks dat de hoge affiniteit receptor voor Ad35 fiber (CD46 receptor) afwezig is op muizen DCs. Dit laatste is bevestigd in een vergelijkende studie tussen rAd35 en rAd5 in een humaan huidmodel. Hieruit is gebleken dat humane DC die CD46 receptoren tot expressie brengen efficiënter getransduceerd kunnen worden met rAd35. Echter er is er geen verschil aangetoond tussen beide vectoren m.b.t. de inductie van antigeen specifieke T cel responsen (hoofdstuk 3.3).

Uiteindelijk hebben deze bevindingen ertoe geleid dat voor verder vaccin ontwikkeling gebruik is gemaakt van adenovirus serotypes die slechts zeldzaam voorkomen in de mens b.v. Ad35. De keuze voor deze vectoren is verder gestimuleerd door het feit dat uitwisseling van meerdere capside eiwitten voor Ad5 leidt tot instabiliteit en virus productie problemen. Daarnaast hebben bovenstaande studies aangetoond dat het design van een optimaal vaccin vector niet alleen bepaald kan worden door middel van studies met antigeen presenterende cellen. Resultaten voortvloeiend uit deze *in vitro* studies zijn niet in overeenstemming met de resultaten verkregen uit *in vivo* vaccinatie studies.
In vervolg studies hebben we onderzoek verricht naar het identificeren van optimale antigeen samenstellingen in de context van een rAd35 vector. Hierbij is gekozen voor het circumsporozoite (CS) eiwit afkomstig van *P. falciparum*. De reden van deze keuze is dat het meest effectieve vaccin op dit moment, RTS,S (dat in 30% van de mensen bescherming biedt) de sequentie van dit CS eiwit bevat. Van nature beschikt het CS eiwit over een glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) sequentie die ervoor zorgt dat het eiwit verankerd wordt in het cel oppervlak, een belangrijk proces in de cel cyclus van de malaria parasiet. Echter de aanwezigheid van een GPI anker sequentie kan nadelige gevolgen voor de efficiëntie van vaccins. Eerdere vaccinatie studies met CS eiwit afkomstig van *P. yoelii* en *P. berghei* (malaria voorkomend in knaagdieren) hebben aangetoond dat het inkorten van de GPI anker sequentie leidt tot verbeterde immuunresponsen. Anticiperend op deze studies zijn er modificaties aangebracht in het CS eiwit van *P. falciparum.* Vaccinatie studies met rAd35.CS laten zien dat deleties in de GPI anker sequentie leiden tot een verhoging van CS specifieke immuunresponsen in muizen (hoofdstuk 2.2).
Vervolgens hebben we een kandidaat rAd35.CS malaria vaccin getest op effectiviteit in aanwezigheid van anti-Ad5 immuniteit in een erkend muis malaria model. Hiervoor is gebruik gemaakt van het *P.yoelii* CS antigen in de rAd35 vector waarmee vaccin effectiviteit bepaald kan worden door middel van een artificieel infectie model met levende *P.yoelii* parasieten. Uit de resultaten van deze studies kan geconcludeerd worden dat (i) de aanwezigheid van anti-Ad35 neutraliserende antilichamen in mensen in malaria endemische gebieden erg laag is ten opzichte van anti-Ad5 immuniteit (ii) rAd35 geïnduceerde immuunresponsen in muizen niet verhinderd worden door aanwezigheid van hoge anti-Ad5 immuniteit dit in tegenstelling tot de rAd5 vaccins (iii) het verlies in rAd5 vaccin effectiviteit is gerelateerd aan het verlies in bescherming tegen malaria infectie (iv) en een vaccinatie strategie waarbij twee keer gebruik gemaakt wordt van eenzelfde vector minder potent is dan het gebruik van twee verschillende adenoviral vectoren b.v. Ad5 in combinatie met Ad35 (hoofdstuk 3.1). Een ander belangrijke vinding beschreven in hoofdstuk 3.1 is dat rAd35 minder potent is in het induceren van immuunresponsen in vergelijking tot rAd5. Echter dit heeft geen consequenties voor de bescherming tegen malaria infectie want deze is namelijk voor beide vectoren gelijk. De observatie dat rAd35 minder immunogeen is wordt ondersteund door resultaten uit studies voor HIV vaccins. Hierin is aangetoond dat een rAd5 HIV vaccin efficiënter is dan het rAd35 vaccine bij gelijke vaccin dosissen in zowel muis als primaten. Op basis van deze resultaten is het onderzoeksprogramma op twee manieren vervolgd: de potentie van beide vaccins, rAd5 en rAd35 zijn verder getest in een humaan model en er is onderzoek verricht naar nieuwe vaccin formuleringen om rAd35 geïnduceerde immuunresponsen verder te optimaliseren in een muis model. Voor de formulering van rAd35 vector met het *P. falciparum* CS antigen is gebruik gemaakt van een aluminium fosfaat ($AlPO_4$) adjuvant. Uit *in vivo* studies is gebleken dat een formulering van rAd35CS/$AlPO_4$ bijdraagt aan significante verhogingen van zowel B cel als T cel responsen tegen het CS eiwit. Deze resultaten in combinatie met het jarenlange gebruik van $AlPO_4$ als geregistreerd adjuvant voor diverse vaccines, maakt het niet ondenkbaar dat een rAd35CS/$AlPO_4$ geformuleerd vaccin gemakkelijk geëxtrapoleerd kan worden naar een

klinische setting (hoofdstuk 3.2). Echter verder onderzoek is vereist om het mechanisme dat ten grondslag ligt aan deze immunologische verbetering verder op te helderen.
Interessant zijn ook de bevindingen dat vaccinatie schema's bestaande uit een prime en boost vaccinatie met rAd35CS/$AlPO_4$ het meest efficiënt zijn (hoofdstuk 3.2). Dit is in tegenstelling tot de resultaten beschreven in hoofdstuk 3.1, waarbij homologe vaccinaties schema's met rAd35, zonder toevoeging van $AlPO_4$ minder efficiënt zijn. Ten slotte zijn er vergelijkingsstudies uitgevoerd met rAd5 en rAd35 waarbij de transductie efficiëntie van APC en T cel inductie bestudeerd is. Hierbij is gebruik gemaakt van een artificieel humaan huidmodel. De resultaten beschreven in hoofdstuk 3.3 laten zien dat de transductie efficiëntie van huid DCs voor rAd35 hoger is dan voor rAd5 maar niet resulteert in hoger CS T cel inductie.

CONCLUSIE

Het werk beschreven in dit proefschrift heeft er toe bijgedragen dat er meer inzicht is verkregen in de betrokkenheid van adenovirale capside eiwitten in vector neutralisatie en cel tropisme. Dit heeft ertoe geleid dat er nieuwe vectoren zijn ontwikkeld gebaseerd op humaan adenovirus serotypen met laag serum prevalentie. Een voorbeeld hiervan is rAd35, een veelbelovend recombinante adenovirus vector voor malaria vaccin ontwikkeling. Een van de redenen voor het gebruik van Ad35 is dat de immuniteit tegen het wildtype virus laag is in mensen die leven in malaria endemische gebieden. Verder zijn rAd35 vectoren in staat om sterke immuunresponsen te induceren in muizen en bescherming te bieden tegen malaria infectie. Tenslotte ondervindt het rAd35 vaccin geen hinder van anti-Ad5 immuniteit en is hierdoor uitermate geschikt voor klinische toepassingen. Evenals rAd5 zijn rAd35 vectoren in staat om humane T cel responsen te induceren. Hiervoor is gebruik gemaakt van een humaan huidmodel, dat sterke overeenkomsten vertoont met een klinische situatie. Als laatste hebben we aangetoond dat de immunogeniteit van een rAd35 vaccine verder verhoogd kan worden door deze te formuleren met een klinisch geaccepteerd adjuvant.
Samenvattend, het werk beschreven in dit proefschrift heeft bijgedragen aan een snelle voortgang van kandidaat malaria vaccins in de preklinische test fase. Dit heeft er mede toegeleid dat op dit moment een rAd35.CS vaccin geïntroduceerd is in de kliniek en in een fase-1 studie wordt getest op veiligheid in gezonde vrijwilligers (USA).