



Doctoral Thesis

## Evaluation of peptide-mediated dendritic cell targeting and particulate adjuvants for immunotherapy

**Author(s):**

Garbani Marcantini, Mattia

**Publication Date:**

2015

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010556485> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22698

***EVALUATION OF PEPTIDE-MEDIATED DENDRITIC CELL TARGETING  
AND PARTICULATE ADJUVANTS FOR IMMUNOTHERAPY***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. Sc. ETH Zurich)

presented by

*MATTIA GARBANI MARCANTINI*

*MSc ETH Biology*

born on *12.03.1984*

citizen of Vergeletto (TI)

accepted on the recommendation of

*Prof. Annette Oxenius*

*Prof. Reto Crameri*

*Prof. Markus Aebi*

*Prof. Peter Schmid-Grendelmeier*

2015

## **Summary**

**Introduction.** In the last decades we observed a steep increase in the worldwide prevalence of allergic diseases. Although rarely fatal, allergies have a significant impact on the quality of life, as well as on the general economy. The most common treatments, mostly corticosteroids and antihistamines, aim at alleviating symptoms but are not curative. An attractive alternative to symptomatic control is the so called allergen-specific immunotherapy, which significantly and persistently reduces symptoms, or even cures allergic diseases. Allergen-specific immunotherapy is known since more than a century and consists of treating the patient with the very same substance that causes the disease (allergen). Repeated injections lead to a re-programming of the immune system and the establishment of tolerogenic and  $T_H1/T_{reg}$  dominated immune responses. To avoid adverse reactions the allergen needs to be administered slowly, starting from a very low amount and gradually increasing the dose over several years. The long duration of treatment, as well as therapy-induced side-effects, strongly reduce the patients' compliance, which is why immunotherapy is chosen only for severe cases. For this reason, there is a strong need for the development of novel therapies. They need to be shorter, exempt from significant side-effects, and require less personal and medical efforts.

**Aim.** In this dissertation we aimed to evaluate two strategies to increase efficacy, and thus patient compliance, of immunotherapies: the use of particulate adjuvants and the targeting of dendritic cells. The first approach aimed to increase the persistence of the antigen in the tissues by means of Strontium-doped hydroxyapatite microspheres (SHAS). The second approach exploited the dendritic cell targeting peptide DCpep to increase the contact of antigens with antigen presenting cells. The ultimate goal of both strategies was to enhance the uptake by antigen presenting cells, thereby accelerating the induction of a  $T_H1/T_{reg}$  dominated immune response. This should result in reduced side-effects and/or the need of fewer injections to obtain a therapeutic effect.

**Results.** Our first approach, which makes use of particulate adjuvants to increase the efficacy of immunotherapies, was successful. We demonstrated the suitability of SHAS for the creation of an allergen depot *in vivo*, and the resulting sustained stimulation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells. We further identified CD11b<sup>+</sup> migratory dendritic cells to be the cell subset that mostly contributed to the prolonged allergen persistence in lymph nodes (LNs). Additionally, using SHAS as an adjuvant showed a low inflammatory profile and reduced side-effects in allergic mice.

In contrast, the second approach, which consisted of targeting dendritic cells with DCpep, showed no efficacy *in vivo*. Through *in vitro* investigations of both, mouse and human cells, we identified a lack of specificity as the main factor responsible for the unexpected outcome. DCpep not only bound the analyzed dendritic cell subsets indiscriminately, but also enhanced construct uptake by monocytes and macrophages.

**Conclusion.** Our data showed which subsets of antigen-presenting cells play a role in the antigen transport upon SHAS-assisted vaccination. Based on our findings of reduced side effects and low inflammatory profile, we suggest SHAS as a low-side effect adjuvant for immunotherapy.

Additionally, we identified lack of specificity as a major issue for antigen-presenting cell targeted therapies. Despite the numerous subsets of antigen presenting cells that have already been identified, no targeting approach has been discovered yet, which is able to discriminate among them. Our data strongly suggested that the accuracy of the targeting has to be carefully determined *in vivo* before drawing conclusions about a potential therapeutic efficacy.

The technical efforts associated with this work led to the development of a method, which allows the measurement of antibody affinity on cells with the Quartz Crystal Microbalance device Attana Cell™ 200. Besides enabling the measurement of affinity in more physiological settings, this novel technology can potentially be used to track cell-antigen interactions during immunotherapy.

## Sommario

**Introduzione.** La prevalenza delle malattie allergiche a livello mondiale è aumentata molto negli ultimi 30 anni. Nonostante un decorso generalmente non-letale, queste malattie hanno un notevole impatto sia sulla qualità di vita del paziente, che a livello economico. La terapia più comune consiste nel combatterne i sintomi con la somministrazione di corticosteroidi e antistaminici. L'unica cura vera e propria è rappresentata dall'immunoterapia allergene-specifica, capace di ridurre sensibilmente i sintomi e, in alcuni casi, di curare le malattie allergiche. L'immunoterapia allergene-specifica consiste nel trattare il paziente con la stessa sostanza che causa la malattia (l'allergene). Iniezioni ripetute portano ad una riprogrammazione del sistema immunitario che è così portato verso una risposta tollerogenica di tipo  $T_H1$ . Per evitare reazioni allergiche, che possono sfociare in uno shock anafilattico, la dose iniziale di allergene per il trattamento deve essere molto bassa. Durante un periodo di anni, questa verrà gradualmente aumentata finché la riprogrammazione sarà completa. Per questo, e a causa degli inevitabili effetti collaterali, la terapia allergene-specifica non gode di una buona reputazione. Solamente pazienti con allergie gravi intraprendono di norma il percorso terapeutico, e sono in molti ad interromperlo. C'è quindi il bisogno di terapie nuove, veloci e con effetti collaterali ridotti e, nel migliore dei casi, anche di una riduzione cospicua del numero delle visite da parte del personale sanitario.

**Obiettivi.** In questa tesi di dottorato si sono valutate due nuove strategie per aumentare l'efficacia degli interventi immunoterapeutici e quindi la loro reputazione. Il primo approccio consiste nell'assorbire l'allergene sulla superficie di microsfere di idrossiapatite contenenti stronzio (SHAS). In questo modo se ne aumenta la persistenza nel tessuto sottocutaneo, riducendo il numero di iniezioni necessarie per un effetto terapeutico. Somministrare l'allergene in forma particellare potrebbe inoltre risultare in una maggior assimilazione da parte di cellule presentatrici di antigeni e quindi in una modulazione benefica della risposta immunitaria. Il secondo approccio ambisce ad aumentare la presentazione dell'allergene direzionandolo verso le cellule dendritiche, con la conseguente genesi di risposte immunitarie dominate da linfociti del tipo  $T_H1/T_{reg}$ . Per direzionare l'allergene abbiamo sfruttato le proprietà di DCpep, un peptide che lega selettivamente le cellule dendritiche. Con questo approccio ci auguravamo di ridurre il tempo di riprogrammazione del sistema immunitario, riducendo quindi il numero di iniezioni necessarie per l'immunoterapia.

**Risultati.** In questo lavoro abbiamo potuto dimostrare quanto le SHAS siano adatte per la creazione di un deposito di antigeni. L'uso delle SHAS ha portato ad una stimolazione prolungata di cellule T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . Questo effetto è principalmente dovuto all'azione di cellule dendritiche migratorie  $CD11b^+$ , che hanno trasportato l'antigene al sistema linfatico per una settimana dall'iniezione. I risultati mostrano quanto le SHAS siano un adiuvante promettente per le immunoterapie. Nel topo

hanno infatti mostrato effetti collaterali ridotti e un ridotto potenziale infiammatorio.

In contrasto, DCpep non ha dato i risultati attesi, soprattutto *in vivo*. Le nostre analisi hanno mostrato come DCpep non sia sufficientemente specifico. DCpep ha potenziato il legame non solo con tutti i tipi di cellula dendritica analizzati, ma anche con monociti e macrofagi. Questo comportamento è stato osservato *in vitro*, sia per cellule del topo, sia per cellule umane. La sottrazione di antigeni da parte di cellule con una ridotta capacità di presentazione (monociti e macrofagi) potrebbe rappresentare un importante svantaggio non solo per questa, ma per tutte le terapie che mirano ad intervenire sulle cellule dendritiche.

**Conclusioni.** Questo lavoro analizza la questione della specificità nelle terapie che mirano alle cellule presentatrici di antigene. Numerosi sottotipi sono stati identificati *in vivo*, con svariate funzioni e capacità di presentazione. A tutt'oggi però nessuna strategia è in grado di mirare specificatamente all'uno o all'altro sottotipo. I nostri dati mostrano come l'accuratezza in questi interventi mirati sia però di grande importanza e debba essere valutata con cura, prima di poter trarre conclusioni sull'efficacia terapeutica. Sull'altro fronte diamo delle prime indicazioni su quali siano i sottotipi di cellule presentatrici di antigene che sono coinvolte nel trasporto di antigene tra la periferia e il sistema linfatico quando questo è applicato associato a microparticelle. Sugeriamo inoltre l'uso delle SHAS come adiuvante per l'immunoterapia, vista la consistente riduzione degli effetti collaterali. Inoltre, la necessità di sviluppare nuovi metodi ha portato allo sviluppo di un nuovo metodo per la misurazione dell'affinità degli anticorpi direttamente sulla superficie di cellule usando l'Attana Cell™ 200, una microbilancia a cristallo di quarzo, che potrebbe essere usato, fra altro, per analizzare come i diversi sottotipi di cellule reagiscono a un trattamento immunoterapeutico.