

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28971> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Rosalia, Rodney Alexander

**Title:** Particulate based vaccines for cancer immunotherapy

**Issue Date:** 2014-10-02

# Chapter 10

English summary  
Nederlandse samenvatting



## English summary

Cancer is the collective name given to several neoplastic diseases, which are characterized by uncontrolled growth of malignant cells, their subsequent metastasis and invasion of healthy tissues impairing their normal functioning.

Cancer is an aggressive and unfortunately often fatal disease and very few patients with metastasis survive beyond two years after diagnosis. This is for a large part caused by the fact that conventional cancer therapies, such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, have so far failed to lead to the desired clinical benefits in most cancer patients with an advanced disease. Novel and more efficacious treatments are therefore highly necessary.

Cancer immunotherapy, a treatment modality based on the activation of the immune system against tumors have resulted in promising clinical observations and reports of durable or even complete responses in end-stage cancer patients. Immunotherapy boosts the tumor-specific responses and thereby facilitates the eradication of malignant cells.

At the Leiden University Medical Center (LUMC), therapeutic vaccinations using synthetic long peptides (SLP) encoding tumor associated antigens (TAA) have been researched for over 10 years. Several (pre-)clinical studies have conclusively shown that SLP efficiently strengthens the immune system against tumors.

SLP are administered via sub cutaneous injections into the skin of cancer patients. Treatment success and the efficacy of therapeutic vaccines for cancer is critically dependent on the efficient delivery of the SLP, or any other cancer vaccine, to Dendritic cells (DC). DC play a prominent role in the immune system, they are considered the primary and most efficient antigen presenting cell (APC) with strong capacity to initiate and orchestrate immune responses. DC can effectively prime and activate tumor specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells (CTL) which are capable of directing recognizing and killing tumor cells.

Montanide-based water-in-oil (w/o) emulsions have been applied to formulate SLP in the majority of clinical trials assessing the therapeutic capacity of SLP-vaccines. The use of Montanide-based formulations, however, is associated with local but prolonged side effects because of the non-biodegradable nature of the (w/o) emulsions. In addition, poorly defined adjuvant properties, sub-optimal delivery of the vaccine to DC, poorly controlled Ag release rates and lack of long-term stability hamper the use of Montanide as a clinically attractive vaccine delivery system. Biodegradable delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) offer a promising alternative approach for SLP-vaccines cancer

vaccines. PLGA is suitable for the preparation of micro- and nanoparticles (NP), which can protect the vaccine-antigen (Ag) from proteolytic enzymatic degradation and rapid clearance, allow co-encapsulation and simultaneous delivery of both Ag and adjuvants, and facilitate Ag delivery to DC. The use of PLGA is Food and Drug Administration (FDA) approved, owing to its biodegradability and biocompatibility, with several slow-release formulations currently on the market.

This thesis describes the results of several studies performed aimed at optimizing the efficacy SLP-vaccines via the encapsulation in PLGA-NP. By encapsulating SLP, or a model protein Ag, in PLGA-NP we attempted to improve the delivery of the SLP to DC, achieve better control of the pharmacokinetics and biodistribution of the vaccine and finally, reduce the therapy related side effects associated with the current (pre-)clinical procedure of administering SLP-vaccines emulsified in Montanide.

The efficiency of Ag-processing by DC is vital for the strength of the ensuing T-cell responses. **Chapter 2** described our studies exploring the Ag-processing and presentation mechanisms underlying the observed *in vivo* therapeutic efficacy of SLP-vaccines. Understanding the mechanisms of SLP-Ag in its free, soluble and chemically unmodified form as it was successfully tested in human trials, allows better understanding of SLP-vaccines and allow further fine-tuning to improve the therapeutic efficacy and improve the treatment of cancer patients. We reported an *in vitro* MHC class I and class II Ag processing and presentation analysis of SLP, in comparison to whole proteins, by murine and human DC. We showed that SLPs were much faster and efficiently processed by DC, resulting in an increased presentation to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. The mechanism of access to MHC class I loading appeared to differ between SLP and proteins. Whole soluble protein Ag ended remained in endo-lysosomes whereas SLP were detected very rapidly outside the endo-lysosomes upon internalization by DC resulting in a proteasome- and TAP-dependent MHC class I presentation much like the Ag processing and presentation pathways of endogenous proteins and peptides generated within all cells of the body. Our results suggest that the efficient internalization of SLP, accomplished specifically by DC and characterized by an alternative and faster intracellular routing, leads to enhanced CD8<sup>+</sup> T-cell activation observed *in vivo*.

SLP-vaccines showed potent therapeutic efficacy against pre-malignant lesions but failed to achieve durable clinical responses in patients with cancer. Therefore, SLP-vaccines require optimization to enhance its therapeutic efficacy in cancer patients. To this end we studied

in **chapter 3** the feasibility to encapsulate SLP in PLGA-NP as a method to improve the immunogenicity of SLP-vaccines, and decrease the onset of adverse effects associated with the use of Montanide in the clinic. The research was aimed at defining physical and formulation parameters necessary to successfully encapsulate SLP in PLGA-NP (PLGA-SLP). Using the standard “double emulsion and solvent evaporation” formulation, well described for the encapsulation of proteins, we observed very low (< 30%) encapsulation efficiency of SLP in PLGA-NP, or extremely high burst release rates (> 70%) upon resuspension of NP in physiological buffers. Therefore, we adjusted the formulation and process parameters and uncovered that the pH of the first emulsion was critical to achieve efficient encapsulation and controlled release of SLP. In particular, we showed that an alkaline inner aqueous phase, instead of the acidic aqueous phase as required to encapsulate proteins, resulted in circa 330 nm sized NP with approximately 40% encapsulation efficiency and low (< 10%) burst release. We next studied the efficacy of MHC class I cross-presentation of these “low-burst release” and CD8<sup>+</sup> T cell activation by DC loaded with PLGA-SLP in comparison to soluble SLP and observed that PLGA-SLP were superior in facilitating MHC class I presentation and CD8<sup>+</sup> T cell activation.

A follow up study was subsequently performed in an attempt to characterize the intracellular mechanisms used by DC to process PLGA-SLP and study the immunological effects on SLP-vaccines when combined with an adjuvant. In **chapter 4** we describe that toll like receptor (TLR) 2 stimulation, using the adjuvant Pam3CSK4, enhances MHC class I presentation of PLGA-SLP by DC. However, this effect was not dependent on the co-encapsulation of Pam3CSK4 together with SLP in PLGA-NP (PLGA-SLP/TLR2L). DC loaded with PLGA-SLP or PLGA-SLP/TLR2L route internalized NP into endo-lysosomal compartments and not the cytosol as occurs with sSLP. We detected PLGA-NP encapsulated SLP for prolonged periods inside these endo-lysosomal compartments which led to sustained MHC class I presentation of PLGA-NP encapsulated SLP for up to 96 hr. Vaccinations with PLGA-SLP and especially PLGA-SLP/TLR2L induced sustained CD8<sup>+</sup> T cell proliferation.

In **chapter 5** we showed that PLGA-NP, encapsulating protein Ag, is a superior vehicle to deliver Ag to DC which could be applied to stimulate Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The DC/PLGA-NP *ex vivo* stimulated CTL used in an adoptive T cell immunotherapy setting showed superior capacity to lyse target cells and were more efficient at tumor control resulting in prolonged survival of tumor bearing animals. In contrast, soluble protein Ag failed to elicit the same effects and thus confirmed that encapsulation of protein Ag or SLP-Ag in PLGA-NP leads to strong improvement of MHC class I presentation and CTL activation.

**Chapter 6** discusses a comparative study between NP versus microparticles (MP) in their efficacy to deliver Ag to DC, facilitate MHC class I Ag presentation and stimulate T and B cell responses *in vivo*. We showed that the efficient uptake of Ag is crucial to induce an immune response. Whereas NP were efficiently internalized by DC upon *in vitro* incubation, MP were poorly detectable inside DC, as a result MHC class I presentation was mainly observed when DC were cultured with NP. Upon s.c. vaccinations with NP and MP, we could detect significantly higher numbers of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice vaccinated with NP compared to MP or OVA emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Moreover, NP led to better antibody responses compared to MP. We concluded that efficient immune responses are better achieved with NP but not MP.

**Chapter 7** and **chapter 8** describes active-targeting strategies to enhance the delivery of vaccine to DC *in vivo*. In general, upon s.c. injection, only a small fraction of the vaccine is delivered to DC whereas the majority is cleared by the body or engulfed by other immune cells. To study how to overcome these negative effects preventing optimal vaccine efficacy we formulated multi-compound particulate vaccines based on PLGA-NP encapsulating TLR and protein-Ag which were subsequently targeted to CD40 (a TNF-receptor family molecule), DEC-205 (a C-type lectin receptor) and CD11c (an integrin receptor). The efficiency of these different targeting strategies to activate DC and elicit a potent CD8<sup>+</sup> T cell response was studied. We observed that targeted PLGA-(Ag/TLR3+7L) NP were more efficiently bound and internalized by DC *in vitro* compared to the control non-targeted NP and reported a small but significantly improved Ag-delivery using CD40-targeted NP compared to DEC-205 or CD11c targeted NP. In comparison to non-targeted NP, all targeted NP stimulated IL-12 production and induced the expression of co-stimulatory molecules by DC to a similar extent. In line with these effects, targeted NP but not non-targeted NP led to strong proliferation and IFN- $\gamma$  production by T cells *in vitro*. Vaccinations with CD40, DEC-205 and CD11c targeted NP showed consistently higher efficacy than non-targeted NP to stimulate CD8<sup>+</sup> T cell responses. There was a trend towards better CD8<sup>+</sup> T cell priming with CD40-targeted NP. Based on these observations we performed a study with the goal to control tumor outgrowth using CD40-targeting of PLGA-(Ag/TLR2+3L) NP-vaccines. Targeting NP to CD40 very efficiently and selectively delivered the vaccine to DC *in vivo* upon s.c. injection and significantly improved priming of CD8<sup>+</sup> T cells against two independent tumor associated Ag. Finally, therapeutic application of CD40-targeted NP led to enhanced tumor control and prolonged survival of tumor-bearing mice whereas non-targeted NP-vaccines failed to do so.

In conclusion, the results described here present sufficient evidence to use PLGA-NP as a vaccine delivery system for SLP-vaccines. Especially the use of targeted PLGA-NP will significantly enhance the delivery of SLP-vaccines to DC and be considered as an alternative for Montanide as clinical vaccine carrier.

## Nederlandse samenvatting

Kanker is de verzamelnaam voor verschillende ziektes waarin ongecontroleerde groei van maligne cellen plaatsvindt. Kanker wordt soms gekenmerkt door het verspreiden en binnendringen van maligne cellen in gezonde weefsels en organen, ook wel uitzaaiingen genoemd. Door deze uitzaaiingen kan het gezonde weefsel niet meer goed functioneren.

Kanker is een agressieve en helaas vaak dodelijke ziekte waarbij weinig patiënten met uitzaaiingen langer dan twee jaar na de diagnose nog leven. De oorzaak is voor een groot deel te verklaren doordat de conventionele kankertherapieën, zoals chirurgie, chemotherapie en radiotherapie, niet goed genoeg werken in kankerpatiënten met een gevorderde ziekte. Nieuwe en meer effectieve behandelingen zijn dan ook zeer noodzakelijk.

Kanker immunotherapie, een behandelmethode gebaseerd op de activatie van het immuunsysteem tegen tumoren, is een veelbelovende therapie en er zijn zelfs gevallen van volledige genezing van terminale kankerpatiënten. Immunotherapie stimuleert de natuurlijke en tumor-specifieke afweer en versterkt het immuunsysteem waardoor de tumorcellen beter herkend en gedood worden.

In het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) heeft men veel ervaring met therapeutische vaccinaties tegen tumoren gebaseerd op synthetische lange peptiden (SLP) die coderen voor de tumor-geassocieerde antigenen. Verschillende klinische studies hebben aangetoond dat SLP zeer efficiënt is in het activeren van het immuunsysteem tegen tumoren.

SLP vaccins worden toegediend via injecties in de huid van de patiënten. Het succes van de behandeling en de efficiëntie van therapeutische vaccins tegen tumoren is sterk afhankelijk van de beschikbaarheid van de SLP (of het vaccine) voor de dendritische cellen (DC's). DC's spelen een belangrijke rol in het immuunsysteem en worden beschouwd als de beste en voornaamste antigeen presenterende cel (APC) met de unieke capaciteit om het immuunsysteem te activeren. DC kunnen tumor-specifieke cytotoxische CD8<sup>+</sup>T-cellen (CTL) programmeren, zodat die tumorcellen kunnen herkennen en doden.

Tot nu toe werden in klinische trials met SLP-vaccins de SLP gemengd in Montanide, een water-in-olie (w/o) emulsie. Het gebruik van Montanide-formuleringen leidt echter tot lokale maar langdurige bijwerkingen omdat de w/o emulsie niet biologisch afbreekbaar is. Bovendien heeft Montanide zwakke immuun-stimulerende eigenschappen en wordt het suboptimaal opgenomen door DC's na injectie in de huid, en is het vrijlaten van de



SLP slecht te reguleren. Bovendien hebben Montanide-formuleringen een beperkte houdbaarheid. Al deze eigenschappen van Montanide belemmeren een succesvol en lange-termijngebruik in de kliniek.

Biologisch afbreekbare afgiftesystemen op basis van poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), een co-polymeer dat bestaat uit melkzuur en glycolzuur, bieden een veelbelovend alternatief voor het toedienen van SLP-vaccins tegen tumoren. PLGA is geschikt voor het formuleren van nano-partikelen (NP) en micro-partikelen (MP) waarin het SLP-vaccin wordt ingekapseld. Deze partikelen beschermen het SLP tegen proteolytische afbraak en verminderen dat het vaccine snel uitgescheiden wordt uit het lichaam.

Het gebruik van PLGA in mensen is goedgekeurd door de Amerikaanse *Food and Drug Administration* (FDA).

Dit proefschrift beschrijft de resultaten van verschillende studies die gericht waren op het optimaliseren van SLP-vaccins door deze in te kapselen in PLGA-NP. Door SLP, of een model eiwit Ag, in te kapselen in PLGA-NP hebben we geprobeerd een betere toediening van SLP aan DC's te bewerkstelligen. Ook wilden we een betere beheersing van de farmacokinetiek en biodistributie van het vaccin bereiken en de bijwerkingen verminderen gerelateerd aan het in Montanide geformuleerde SLP-vaccin.

De efficiëntie van Ag-processing door DC's is essentieel voor de sterkte van de daaropvolgende T-cel immuunresponsen. **Hoofdstuk 2** beschrijft een *in vitro* analyse van de MHC klasse I en klasse II Ag-processing en presentatie van SLP, in vergelijking met het eiwit Ag, door muis en humane DC's. We hebben aangetoond dat SLP veel sneller en efficiënter verwerkt wordt door DC's, wat leidt tot betere stimulering van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen. Het mechanisme van toegang tot MHC klasse I processing was verschillend tussen SLP en eiwitten. Na opname door DC's was het eiwit Ag voornamelijk aantoonbaar in intracellulaire compartimenten, de endo-lysosomen. SLP was in tegenstelling tot eiwitten nauwelijks in de endo-lysosomen detecteerbaar, maar juist zeer snel in het cytosol van de cel aanwezig. Vervolgens werden SLP verwerkt, vergelijkbaar met endogene antigenen geproduceerd in cellen van het lichaam. Onze resultaten suggereren dat een efficiënte internalisatie door DC's van SLP, gekenmerkt door een alternatieve en snellere intracellulaire routing, leidt tot een verhoogde CD8<sup>+</sup> T-cel-activatie.

SLP-vaccins hebben geleid tot veelbelovende resultaten in patiënten met pre-maligne vormen van kanker. Maar SLP-vaccins zijn minder succesvol in patiënten met vergevorderde kanker. Daarom is het noodzakelijk dat SLP-vaccins verbeterd worden. In **hoofdstuk 3** heb-

ben we bewezen dat het inkapselen van SLP in PLGA-NP (PLGA-SLP) een goede methode is om de immunogeniciteit van SLP-vaccins te verbeteren. In het bijzonder hebben we aangetoond dat MHC klasse I presentatie en CD8<sup>+</sup> T-cel-activatie door DC's sterk verbeterd worden in vergelijking met niet ingekapseld, oftewel vrij, SLP.

Op basis van deze resultaten werd een vervolgonderzoek uitgevoerd om de intracellulaire mechanismen te beschrijven die door DC worden gebruikt om PLGA-SLP te verwerken. Ook werd onderzocht of de toevoeging van een adjuvant de immunogeniciteit van PLGA-SLP verhoogt. De resultaten hiervan worden beschreven in **hoofdstuk 4**, waarin we beschrijven dat het adjuvant Pam3CSK4 sterk de MHC klasse I presentatie van PLGA-SLP door DC's verbetert zonder dat het samen met de SLP ingekapseld moet zijn in de NP. DC's beladen met PLGA-SLP kunnen langdurig SLP Ag beschermen en kunnen ook voor een langere periode CD8<sup>+</sup> T-cellen activeren, bepaald tot 96 uur.

In **hoofdstuk 5** laten we zien dat PLGA-NP ook gebruikt kan worden om tumor-specieke CD8<sup>+</sup> T-cellen te stimuleren *ex vivo*. Transplantatie met de DC/PLGA-NP *ex vivo* gestimuleerde CTL leidde tot een zeer sterk therapeutisch effect tegen tumoren.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de verschillen tussen NP en MP om DC te beladen met een Ag en vervolgens MHC klasse I Ag presentatie te induceren. In muizen hebben we bestudeerd of NP beter zijn dan MP om T- en B-cel-responsen te activeren. We concludeerden dat een efficiënte opname van Ag door DC's essentieel is om een immuunrespons te induceren. Opname van Ag was het sterkst met het gebruik van NP. Bij s.c. vaccinaties met NP en MP detecteerden wij significant hogere Ag-specifieke CD8<sup>+</sup> T-cellen na vaccinaties met NP ten opzichte van MP. Bovendien leidde NP tot betere antilichaamresponsen. We concludeerden dat een efficiënte immuunrespons beter wordt bereikt met NP maar niet met MP.

In **hoofdstuk 7** en **hoofdstuk 8** bestuderen we strategieën om PLGA-NP-vaccins specifiek te sturen naar DC's, *DC-targeting*. In het algemeen komt slechts een kleine fractie van een geïnjecteerd vaccin bij de DC's terecht, terwijl de meerderheid wordt uitgescheiden door het lichaam of door andere immuuncellen opgenomen wordt. Om deze negatieve effecten te voorkomen en de werking van een vaccin te verbeteren hebben wij PLGA-NP-vaccins geformuleerd die zowel Ag en adjuvantia bevatten, die vervolgens werden getarget naar moleculen welke tot expressie komen op de oppervlakte van DC's. We hebben vaccins geformuleerd gericht tegen CD40 (een molecuul van de TNF-receptorfamilie), DEC-205 (een C-type lectinereceptor) en CD11c (integrinereceptor). De efficiëntie van deze verschillende targetingstrategieën om DC's te activeren en een krachtige CD8<sup>+</sup> T-cel-respons op te

wekken werd onderzocht. We ontdekten dat getargette PLGA-(Ag/TLR3+7L) NP efficiënter werden gebonden en geïnternaliseerd door DC's *in vitro* in vergelijking met de controle niet-getargette NP. In vergelijking met niet getargette NP, kon alle getargette NP IL-12 de productie door DC's stimuleren. Getargette NP, maar niet de ongetargette NP, leidde tot een sterke T-cel-respons en IFN- $\gamma$ -productie door T-cellen. Vaccinaties met CD40, DEC-205 en CD11c getargette NP vertoonden constant een hogere mate van CD8<sup>+</sup> T-cel-stimulatie van ongetargette NP. CD40 getargette NP was iets beter in het stimuleren van CD8<sup>+</sup> T-cel-responsen. Op basis van deze observaties hebben we een onderzoek uitgevoerd met als doel de tumoruitgroei te blokkeren door middel van toediening van CD40-getargette PLGA-(Ag/TLR2+3L) NP-vaccins. Targeting van NP-vaccins naar CD40 werkte zeer efficiënt en leverde selectief het vaccin af bij DC na injectie in de huid. Dit leidde tot significant betere activatie van CD8<sup>+</sup> T-cellen. Tenslotte toonden we aan dat CD40-getargette NP-vaccins een therapeutisch effect hebben en de levensduur van muizen met een tumor verlengde.

Gebaseerd op de resultaten beschreven in dit proefschrift concluderen wij dat PLGA-NP een efficiënt middel is om de effectiviteit van SLP-vaccins te verhogen. Vooral het gebruik van getargette PLGA-NP zullen tot een aanzienlijke verbetering leiden en moeten naar onze mening beschouwd worden als een alternatief voor Montanide voor klinische toepassingen.



