



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Formulation of peptide-based cancer vaccines

Heuts, J.M.M.

Citation

Heuts, J. M. M. (2022, September 21). *Formulation of peptide-based cancer vaccines*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3464323>

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/1887/3464323>

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

APPENDICES

Nederlandse samenvatting

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en immunologische evaluatie van twee verschillende kankervaccinatiestrategieën voor op peptiden gebaseerde kankervaccins. Beide strategieën, liposomale inkapseling en directe conjugatie aan een immuunstimulerend adjuvans, zijn bedoeld om te worden gecombineerd met neoantigeenbevattende synthetische peptide (SP)-sequenties. Om dergelijke gepersonaliseerde kankervaccins te formuleren is een flexibel platform nodig dat een breed scala aan fysisch-chemisch verschillende SP kan herbergen, dit omdat meerdere neo-epitopen op unieke wijze tot expressie worden gebracht per patiënt. Na formulering zou het vaccinatieplatform in staat moeten zijn om effectieve en tumor specifieke T-cel immuun responsen te induceren, wat in dit proefschrift werd geëvalueerd met behulp van *in vitro* en *in vivo* preklinische modellen.

In **hoofdstuk 2** wordt de literatuur over kationische nanodeeltjes in kankervaccins besproken. Omdat alleen een (neo)antigeen geen effectief (gepersonaliseerd) kankervaccin is, moet het zo worden geformuleerd dat het een effectieve immuunrespons induceert. Om een succesvol kankervaccin te zijn moeten kankervaccinformuleringen zorgen voor de afgifte van antigeen aan dendritische cellen (DC) en vervolgens antigeen specifieke T-cellen induceren. Het is aangetoond dat kationische nanodeeltjes de werkzaamheid van het vaccin voor een verscheidenheid aan tumoren verbeteren door efficiënte antigeenafgifte aan en daaropvolgende activering van DCs. De DCs induceren vervolgens efficiënt antigeen specifieke cellulaire immuun responsen, die een belangrijke rol spelen bij de immuniteit tegen kanker. De nanodeeltjes kunnen worden gecombineerd met synthetisch geproduceerde antigenen (synthetische peptiden, mRNA en DNA) en maken de productie van multi-epitooptvaccins mogelijk onder de huidige *Good Manufacturing Practice* (cGMP)-omstandigheden. De intradermale toediening van dergelijke vaccins is van bijzonder belang omdat relatief grote hoeveelheden DCs in de huid aanwezig zijn en goed toegankelijk zijn voor medicijnafgifte.

Voor gepersonaliseerde kankervaccinatie is het de bedoeling dat een groot aantal patiënt-specifieke peptiden (~20) met een grote verscheidenheid aan fysisch-chemische eigenschappen in één enkel gepersonaliseerd vaccin moeten worden geformuleerd. Daarom zijn in **hoofdstuk 3** drie methoden ontwikkeld om SPs met een breed scala aan fysisch-chemische eigenschappen in kationische liposomen te verpakken. De fysisch-chemische kenmerken (deeltjesgrootte, homogeniteit en lading) van alle liposomale formuleringen waren vergelijkbaar na het beladen met de verschillende SPs. Alle formuleringen leverden het SP efficiënt af aan DC die vervolgens antigeen specifieke CD8⁺ T-cellen *in vitro* konden activeren. Dit wijst op een verbeterde immunologische activiteit van de antigene peptiden na inkapseling in kationische liposomen. Bovendien gaf modellering aan dat het fysisch-chemische bereik van SP sequenties, geselecteerd in deze studie, de meerderheid van natuurlijk voorkomende peptidesequenties dekte

(n = 5546) die theoretisch kunnen worden afgeleid van verschillende humane eiwitten. Gecombineerd gaven deze resultaten aan dat kationische liposomen een veelbelovende formuleringstrategie bieden voor multi-epitop gepersonaliseerde kankervaccins.

Intradermale vaccinatie heeft veel potentie voor de toediening van kankervaccins. De klassieke “Mantoux”-methode, die injectienaalden en injectiespuiten vereist en relatief grote volumes injecteert, heeft meerdere nadelen. Daarom werd in **hoofdstuk 4** de toediening van kationische liposomen door holle microneald-gemedieerde micro-injecties bestudeerd. Het micronealdensysteem was in staat om op herhaalbare wijze nauwkeurig volumes tussen 1 – 10 μL te doseren. In *ex vivo* menselijke huid was het micronealdensysteem in staat om vergelijkbare doses geneesmiddel af te geven in vergelijking met klassieke injectienaald-gemedieerde injecties maar bij veel lagere volumes. Dit is vooral interessant voor gepersonaliseerde kankervaccins waarin meerdere neo-epitopen zullen worden opgenomen en slechts beperkte hoeveelheden vaccin zullen worden geproduceerd. Kationische liposomen, beladen met het humaan papilloma virus (HPV)-E7 afgeleide SP, induceerden op efficiënte wijze functionele CD8⁺ en CD4⁺-T-cellen in muizen na vaccinatie met het micronealdensysteem. Vergelijkbare doses werden toegediend via klassieke injectienaalden en het micronealdensysteem welke gebruik maakte van een 6-voudig lager volume en resulteerde in een verbeterde immunogeniciteit. Bovendien werd de injectiediepte volledig gecontroleerd door het micronealdensysteem wat resulteerde in diepte- en volume gecontroleerde toediening van het vaccin op een minimaal-invasieve manier.

Om SP-geladen kationische liposomen in de klinische praktijk te kunnen produceren moeten er analytische methoden aanwezig zijn om zowel het lipide- als het peptidegehalte in de (gepersonaliseerde) liposomale kankervaccinformuleringen te kwantificeren. Daarom werd in **hoofdstuk 5** een *reversed-phase ultra-performance* vloeistofchromatografie (RP-UPLC) methode ontwikkeld die zowel lipiden (DOTAP, DOPC) als twee fysisch-chemisch verschillende SP scheidt en kwantificeert. Na scheiding werden peptiden en lipiden gekwantificeerd met aanvaardbare nauwkeurigheid en precisie zoals beschreven in de ICH-richtlijn validatie van analytische procedures (12). De experimenten tonen aan dat de lipiden en peptiden geen wederzijdse invloed hadden op hun kwantificering en hiermee kon een lipide-extractie tijdens monster voorbereiding worden uitgesloten. Hierdoor wordt de monstervoorbereiding een stuk eenvoudig en een bron van potentiële fouten uit het proces gehaald. Deze procedure is vooral belangrijk voor op peptiden gebaseerde gepersonaliseerde kankervaccins aangezien er een meerdere peptiden (~20) met een grote verscheidenheid aan fysisch-chemische eigenschappen (zie hoofdstuk 3) in één enkel vaccin worden voorzien geformuleerd.

In **hoofdstuk 6** wordt een multi-epitop vaccin beschreven dat is samengesteld uit zeven verschillende neo-epitopen SPs, zowel MHC klasse I als MHC klasse II gepresenteerd, afzonderlijk ingekapseld in kationische liposomen die respectievelijk CD8 cytotoxische

T cellen of CD4 T helper cellen kunnen activeren. De neo-epitopen die in dit onderzoek zijn gebruikt, zijn afkomstig van het colorectale kankermodel van de muis (MC-38) en de liposomen werden bereid en geanalyseerd zoals beschreven in de hoofdstukken 3 en 5. Alle SPs werden afzonderlijk ingekapseld en de resulterende liposomen hadden vergelijkbare grootteverdelingen en waren positief geladen. De totale hoeveelheden DOTAP als DOPC in de uiteindelijke formulering waren vergelijkbaar in alle formuleringen en het SP gehalte was gemiddeld 25%, hetgeen wijst op een efficiënte belading van de SP. De liposomaal geformuleerde MHC klasse I neo-epitopen activeerden op efficiënte wijze neo-epitoopecifieke CD8⁺ T-cellen in *in vitro* experimenten. Gecombineerde vaccinatie met vier verschillende MHC klasse I neo-epitopen, afzonderlijk geladen in kationische liposomen, induceerde efficiënt tumor-specifieke CD8⁺ T-cellen. Dit geeft aan dat de liposomale neo-epitopen kunnen worden toegediend als een enkele cocktailinjectie. Vaccinatie met een cocktail van twee MHC-I neo-epitopen en drie MHC-II neo-epitopen verbeterde significant de tumor-specifieke CD8⁺ T-cel-inductie. Bovendien beschermde het liposomale combinatievaccin van MHC-I en MHC-II neo-epitopen muizen tegen de uitgroei van MC-38-tumoren. Langdurige bescherming in deze muizen werd aangetoond met tumor *rechallenge*, een tweede toediening van MC-38 tumor cellen. De studie toont aan dat kationische liposomen een zeer geschikte formulering zijn voor op SPs gebaseerde neo-epitoopevaccins.

Een verkennend onderzoek naar het werkingsmechanisme van kationische liposomen in op peptiden gebaseerde kankervaccins wordt beschreven in **hoofdstuk 7**. De biodistributie van liposomen na intradermale vaccinatie werd bestudeerd door gebruik te maken van nabij-infrarood gelabelde lipiden en (lipo)peptiden. De invloed van liposomale lading op de *in vivo* biodistributie, T-cel priming en functionaliteit werd bestudeerd door gebruik te maken van met lipopeptide beladen kationische, neutrale en anionische liposomen. Kationische liposomen beladen met lipopeptide waren detecteerbaar op de injectieplaats tot 2 weken na vaccinatie, gevolgd door neutrale en anionische liposomen welke respectievelijk 6 en 2 dagen detecteerbaar waren. Alleen de formuleringen die kationische liposomen en antigeen bevatten, hetzij ingekapseld of gemengd, waren in staat om specifieke CD8⁺ T-cellen te induceren die in staat zijn tumorgroei te remmen. Vaccinatie met ingekapseld antigeen induceerde 10 keer hogere antigeen specifieke CD8⁺ T-cellen in bloed t.o.v. vaccinatie met kationische liposomen gemengd met peptide. Profylactische vaccinatie met peptide ingekapseld in kationische liposomen voorkwam tumor uitgroei bij 100% van de muizen, terwijl peptide gemengd met kationische liposomen slechts 25% van de muizen beschermde tegen tumor uitgroei. *In vitro* is geobserveerd dat kationische liposomen de opname van ingekapseld peptide of eiwit door DC sterk verhogen. Het antigeen was detecteerbaar in de DC tot 72 uur na incubatie en de dendritische cellen waren nog steeds in staat om antigeen specifieke CD8⁺ T-cellen te activeren. De resultaten van deze verkennende studie geven aan dat kationische liposomen langdurige antigeenblootstelling mediëren en aanhoudende antigeenkruispresentatiecapaciteit door dendritische cellen vergemakkelijken.

Hoofdstuk 8 beschrijft chemische conjugatie van het nieuwe Toll-like receptor (TLR)-2 ligand mini-UPam aan twee verschillende humane neo-epitopen, een MHC klasse I en MHC klasse II epitoom, afgeleid van een melanoompatiënt. Deze directe conjugatie resulteerde in een twee-in-een systeem: één molecuul dat zowel antigeen als een immuun-stimulerend adjuvans bevat. Aangezien de mini-UPam slechts één palmitoylketen bevat, in plaats van drie zoals in het klassieke TLR-2-ligand Pam3CysSk4, is dit ligand chemisch beter toepasbaar voor de productie van op peptiden gebaseerde kankervaccins door oplosbaarheidsproblemen van hydrofobe SP te verminderen. Covalente binding van mini-UPam aan beide neo-epitoom-bevattende SP, die humane melanoom-afgeleide neo-epitopen bevatten, kan humaan TLR-2 effectief activeren. Humane antigeen presenterende cellen geladen met de mini-UPam-SP-conjugaten waren in staat om patiënt-afgeleide neo-epitoom-specifieke CD8⁺- en CD4⁺-T-cellen efficiënt te activeren. Samenvattend, mini-UPam is een veelbelovende simpele immunogene modifier voor op peptiden gebaseerde gepersonaliseerde kankervaccins.