

Evaluation of adenoviral vectors as vaccine for malaria

Thesis by: **Olga Ophorst**

Promotor: Prof. dr. J. Goudsmit
Co-promotor: Dr. M.J.E. Havinga

University of Amsterdam,
Amsterdam, the Netherlands

Date: 15 February 2006

Research described in the thesis was performed at Crucell Holland B.V., Leiden, The Netherlands and at the New York University, New York, USA

Summary and Samenvatting (Dutch)

SUMMARY

Every year, more than one million people, mainly young children under the age of five, succumb to malaria. In spite of all efforts made to prevent malaria transmission and clinical disease, no effective vaccine is available yet. Since classical vaccine technology has thus far failed, novel approaches to battle the human *Plasmodium falciparum* parasite are in high demand. Hereto, naked DNA vaccines and live vector based vaccines show promise because they are potent in eliciting antigen specific cellular immune responses, which are usually poorly induced using classical vaccine approaches. From a manufacturing perspective it can however be argued that currently only live vector based vaccines can be made at sufficient scale to ensure the hundreds of millions of vaccine doses required to fight malaria and therefore much research attention is focused on this technology. Recombinant Ad5 vectors have been studied extensively as vaccine carrier for antigens from different pathogens and have shown to induce potent antigen-specific cellular immune responses in diverse pre-clinical studies. However, a major limitation for clinical utility of rAd5-based vaccines is the high sero-prevalence and high titer of neutralizing antibodies against Ad5 in human populations, which have been shown to blunt Ad5 based vaccine potency in pre-clinical models and early clinical trials. Also, in vitro studies have shown that the Ad5 virus poorly infects antigen-presenting cells that are primarily involved in immune induction. With the aim to move forward promising adenovirus-based malaria vaccines into clinical trials, pre-existing immunity against the classical Ad5 vector needed to be addressed as well as identifying whether antigen specific immune responses could be further boosted when employing adenoviral vectors that are improved in their ability to deliver antigens to antigen presenting cells. Reasoning from the perspective that adenovirus capsid proteins (hexon, fiber, penton) must contain the major B-cell epitopes and the knowledge that the fiber protein determines cell

tropism, capsid chimeric Ad5 vectors were constructed that carried the fiber protein from adenovirus type 35 since previous studies had identified that this vector well infects human monocyte derived DC as compared to rAd5 vector. This vector, called rAd5Fib35, was tested for its ability to circumvent anti-Ad5 neutralizing activity and further studies were employed to better understand antigen presenting cell uptake and immune induction *in vitro* and *in vivo* (chapter 2.1). From these experiments several important conclusions could be drawn. First, exchange of only fiber protein did not result in bypass of anti-Ad5 immunity in either mice or nonhuman primates. Second, rAd5.Fib35 vector very poorly infected mouse dendritic cells as compared to rAd5 due to the absence of a high affinity CD46 receptor for the Ad35 fiber, however *in vivo* studies in mice showed comparable levels of immune induction. This finding was further strengthened by studies showing that a rAd35 vector, superior as compared to Ad5 for transduction of human dendritic cells, also proved equally potent in the induction of T-cell responses in a human artificial skin model (chapter 3.3). These findings had important implications for further vector design since it directly resulted in the preferred use of vectors based on a rare human serotype (Ad35) as opposed to capsid chimeric Ad5 vectors. Latter because a rAd5 vector carrying all capsid proteins derived from an alternative serotype could not be viably re-created. These results also led to the conclusion that decisions on ultimate vector design, based on *in vitro* antigen presenting cell assays have to be carefully interpreted, as they clearly do not represent an *in vivo* situation.

Next experiments were performed to identify the preferred antigen and antigen format derived from *Plasmodium falciparum* within the context of the chosen vaccine carrier, i.e. the rAd35 carrier. The circumsporozoite (CS) protein was chosen as preferred antigen for insertion into the rAd35 carrier given the knowledge that the most effective vaccine to date (30% protection in field trials), called RTS,S, contains this protein.

The CS protein in its native confirmation carries a so-called GPI anchor, which attaches the CS protein to the cell surface, an important process in the parasite life cycle. However, previous studies with the CS protein derived from rodent *Plasmodium* species, i.e., *P. yoelii* and *P. berghei*, demonstrated that deletion of the GPI anchor improved CS immune responses in vaccine settings. Based on these findings we modified the CS protein from *P. falciparum* which causes high mortality in humans, and could demonstrate that deletion of the GPI anchor from this protein also resulted in increase immune induction in mice within the context of rAd35 (chapter 2.2).

Next we tested the candidate rAd35.CS malaria vaccine for its potency and ability to bypass anti-Ad5 neutralizing activity in an established mouse model. Hereto the CS protein derived from the *P. yoelii* was inserted into rAd35 and mice were subsequently being challenged with *P.yoelii* sporozoites. From these studies it could be concluded that (i) anti-Ad35 neutralizing activity in malaria endemic areas is very low in contrast to Ad5 neutralizing activity, (ii) rAd35 induced immune responses in mice are not hampered by the presence of high level anti-Ad5 immunity in contrast to Ad5-based vaccine potency which proved severely hampered, (iii) presence of high levels of anti-Ad5 immunity proved to severely blunt not only immune responses but resulted in loss of protection, this in contrast to the use of rAd35 which proved unaffected, and (iv) any homologous prime-boost regiment is less potent as compared to using two distinct adenoviral vectors as priming or boosting vaccine (chapter 3.1) . Another important finding from the studies described in chapter 3.1 was that rAd35 in mice elicited less potent immune responses as compared to rAd5 based vaccines although both proved equally protective. This observation was however further strengthened by studies within the HIV field demonstrating in both mice and monkeys that rAd5 elicits more potent immune responses as compared to the rAd35 vector at equal dosing. It is therefore that a two-track research program was followed whereby on the one hand studies were initiated to identify whether also in a human *in vitro* model rAd35 is less potent as compared to Ad5 and on the other hand studies were initiated to identify whether immune responses using rAd35 could be improved in mice.

In the latter case we tested whether formulation of the rAd35 vector carrying the *P. falciparum* CS antigen with adjuvants could improve immune responses in mice. From these studies we learned that addition of aluminium phosphate (AlPO₄) to rAd35 vaccine improved both B and T-cell responses against the CS antigen, a finding that could be directly extrapolated to a clinical setting since AlPO₄ has been used as adjuvant in registered vaccines for decades (chapter 3.2). Further work is needed to better understand what mechanism underlies the improvement in immune responses since clearly the formation of a complex between rAd35 vector and AlPO₄ is not required. Interestingly, the results also showed that vaccination regimen wherein AlPO₄ was applied for both prime and boost vaccination was the most efficient one (chapter 3.2). Finally, detailed studies were performed comparing rAd5 and rAd35 vector for antigen presenting cell uptake and stimulation of T-cell responses in an artificial human skin model, which represents a model as close to a clinical setting as possible. The data obtained demonstrated that rAd35 is more potent than Ad5 in the transduction efficiency of dendritic cells residing in human skin in turn resulting in equal induction of CS specific T-cell response (chapter 3.3).

CONCLUSION

The work performed in light of this thesis has helped to better understand which adenoviral capsids are involved in neutralization and cell tropism. This has fueled research into developing novel adenoviral vectors based on rare human serotypes. One of such vectors i.e. rAd35 has been developed that shows high promise for malaria vaccine development since the work performed here has shown that (i) human individuals living in malaria endemic countries carry only low level anti-Ad35 neutralizing activity as compared to Ad5, (ii) the Ad35 vector elicits immune responses against the malaria parasite in mice that proved to afford protection, (iii) the Ad35 vector is not hampered by the anti-Ad5 preexisting immunity improving the clinical prospect of this vector. Furthermore, the ability of Ad35 to elicit antigen specific immune responses equals that of the commonly used Ad5 vector in a human artificial skin model that is as close to a clinical setting as possible. In addition it has been demonstrated that the potency of the Ad35 vector can be improved through formulation with clinically accepted adjuvant resulting in the prospect of either boosting immune responses or reducing vaccine dosing.

As such this work has helped to advance a promising malaria vaccine candidate through pre-clinical studies. Currently the rAd35.CS vaccine is being tested in a phase I clinical trial (USA) in healthy volunteers for its safety profile.

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 monocytten 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 capsid 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 circumsporozoïte (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 glycosylphosphatidyl 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 antigeen 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 antigeen is gebruik gemaakt van een aluminium fosfaat (AlPO₄) adjuvant. Uit *in vivo* studies is gebleken dat een formulering van rAd35CS/AlPO₄ 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 AlPO₄ als geregistreerd adjuvant voor diverse vaccines, maakt het niet ondenkbaar dat een rAd35CS/AlPO₄ 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/AlPO₄ 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 AlPO₄ 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 toe geleid 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).