

**HARNESSING IMMUNE SYSTEM FOR THE  
DEVELOPMENT OF THERAPEUTICS AGAINST  
CANCER AND COVID-19**

**ANJALI BARNWAL**



**CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING  
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI  
MAY 2023**

©Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2023

# **HARNESSING IMMUNE SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF THERAPEUTICS AGAINST CANCER AND COVID-19**

by

**ANJALI BARNWAL**

**CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING**

*Submitted*

**In fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy**

*to the*



**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**MAY 2023**

## **Declaration**

The research work embodied in this thesis entitled “Harnessing Immune System for the Development of Therapeutics against Cancer and COVID-19” is carried out under the supervision of Dr Jayanta Bhattacharyya and submitted in the Centre for Biomedical Engineering, Indian Institute of Technology Delhi. This work is original and has not been submitted in part or in full, for any degree or diploma to this or any other university.

I hereby confirm the originality of the work.

Anjali Barnwal

## **Certificate**

I certify that Ms. Anjali Barnwal, a bonafide Ph. D student at Centre for Bio-medical Engineering, Indian Institute of Technology Delhi, has carried out research work under my direct supervision. The investigations, observations and the conclusions reported by her in this thesis entitled “Harnessing Immune System for the Development of Therapeutics against Cancer and COVID-19” being submitted for the award of Ph. D degree in Bio-medical Engineering are her original contributions to the Biomedical Sciences. It is also certified that she has not submitted the same in part or in full to this or any other University for the award of a degree or diploma.

(JAYANTA BHATTACHARYYA)

## CONTENTS

Acknowledgment	I
List of Abbreviations	IV
Abstract	VI-XI
CHAPTER 1: Introduction	1-36
1.1 Immunity in Different Diseases	1
1.2 Cancer Immunity and Inflammation	2
1.2.1 Tumor Promoting Inflammation	5
1.2.2 Mediators of TPI	7
1.2.3 Neutralization of TPI	10
1.3 Covid-19	26
1.3.1 Immunity in Covid-19	28
1.3.2 Therapeutic Approaches	30
1.4 References	32
CHAPTER 2: DC derived exosome and CSF-1R inhibitor shows a synergistic antitumor efficacy	
2.1 Introduction	37
2.2 Experimental Section	39
2.3 Results	46
2.4 Discussion	66
2.5 References	69
CHAPTER 3: A multifaceted nano DEVIL to avert the immunosuppressive tumor microenvironment and IL-12 associated toxicities	
3.1 Introduction	73
3.2 Experimental Section	75
3.3 Results	83

3.4 Discussion	104
3.5 References	108
CHAPTER 4: Repurposing of Ponatinib as PD-L1 inhibitor	
4.1 Introduction	112
4.2 Experimental Section	114
4.3 Results	123
4.4 Discussion	162
4.5 References	170
CHAPTER 5: Combinatorial approach to neutralize tumor promoting inflammation	
5.1 Introduction	176
5.2 Experimental Section	177
5.3 Results	182
5.4 Discussion	191
5.5 References	192
CHAPTER 6: SARS-CoV-2 spike protein-activated dendritic cell-derived extracellular vesicles as cell free vaccine	
6.1 Introduction	194
6.2 Experimental Section	196
6.3 Results	203
6.4 Discussion	217
6.5 References	221

## Acknowledgement

*I would like to thank many people who were directly or indirectly involved and helped me in completing my Ph.D. I am grateful to all those people.*

*Most important person in this journey, my supervisor Prof. Jayanta Bhattacharyya, without whom I would not have been able to complete my Ph.D. You are a great mentor, scientist and more importantly an empathetic human being. You have always been there to guide, motivate, and to support me in every possible way. You are the guiding light of my life which I will always be grateful for. During my Ph.D., many a times I used to get demotivated but you always encouraged me by making me aware of my own potential. Thank you for showing faith in me and giving me the freedom to work on new things. I always say and would say again that getting a supervisor like you will be a blessing for any student.*

*I am grateful to all my lab mates Ahana, Abhishek, Palak, Anjali, Vidit, Monu, and Anindita for their help whenever needed and my special thanks to both Ahana and Vidit for making the stressful times fun. There must be an extraordinary thanks to Ahana who has been the family away from home. I would like to thank my friends and seniors Upasana, Nilakhi, Indu, Shilpi, Abhishek, Preeti, and Deep for always being there. Furthermore, I was grateful to have found so many supportive friends in IIT, Shreemoyee, Sagar, Ayushi, Abhishek, Anees, and Dharmesh, who were always there to help and encourage me.*

*I would like to thank the SRC members Prof. Pramit K. Chowdhury, Prof. Deepak Joshi, and Prof. Archana Chugh for their suggestion and motivation throughout. I would like to extend my gratitude to NII, Jamia Hamdard, RCB Faridabad, and CDRI Lucknow for allowing me to do animal experiments. I would like to express my gratitude to CBME for all the facilities and IIT Delhi for*

*providing me with the scholarship that allowed me to complete this thesis. Words are not enough to thank my parents and my loved ones for their unconditional love and constant support which gave me the strength to stay focused and motivated. To my maa and papa, my biggest cheerleaders, you always believed in me and gave me the wings to fly. Everything I am today is because of your love and support. My sisters, who encouraged me for higher studies, who are the reason I am at this stage. My sister sacrificed her studies so that I can achieve everything she only dreamt of. To my brother, who showed me the right direction and always encouraged and motivated me.*

Anjali Barnwal

March 2023

*To my papa, my biggest cheerleader who gave me the wings to fly,*

*To my maa, who always loved and believed in me unconditionally.*

## Abbreviations

APC	Antigen Presenting Cell
DC	Dendritic Cell
Teff	Effector T-cell
Treg	Regulatory T-cell
TME	Tumor Microenvironment
TCR	T-cell Receptor
TAA	Tumor Associated Antigen
TSA	Tumor Specific Antigen
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cell
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
TADC	Tumor Associated Dendritic Cell
CAF	Cancer Associated Fibroblast
ECM	Extracellular Matrix
NK	Natural Killer
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
HSV	Herpes Simplex Virus
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
MoDC	Monocyte-derived Dendritic Cell
PGE2	Prostaglandin E2
SLP	Synthetic Long Peptide
Dex/DEV	DC-derived Exosome/Extracellular Vesicle
TAM	Tumor Associated Macrophage

GM-CSF	Granulocyte monocyte Colony Stimulating Factor
HIF	Hypoxia Inducing Factor
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cell
CSF-1R	Colony Stimulating Factor-1 Receptor
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
RBD	Receptor Binding Domain
TIM-3	T-cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain-3
PD-1	Programmed Cell Death Protein-1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
NTA	Nano-tracking Analysis
SEM	Scanning Electron Microscope
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophage

## Abstract

Immunotherapy is a biological therapy that harness immune system to target, recognize, and kill the cells which is either transformed or infected. Immunotherapies are divided into passive or active based on their mechanism of action to activate the immune response. Active immunotherapy aims to induce host immunity against any disease or infectious agents. Few commonly used active immunotherapies are vaccines, cytokines etc. Furthermore, passive immunotherapy involves the administration of immune system components such as T-cell and monoclonal antibodies (mAbs) to target infected or cancerous cells. Various immunotherapy approaches including vaccines have successfully been used for the treatment of cancer and infectious diseases like Covid-19.

Despite the use of different strategies of immunotherapy in clinics or preclinical models, mortality related to cancer remain one of the leading cause of death worldwide. The failure of most of the treatment is associated with tumor promoting chronic inflammation (TPI) which supports the development and metastasis of malignant cells. Owing to the interesting connection between cancer and inflammation, neutralization of TPI seems to be an eminent approach for a more proficient anticancer treatment. There are different approaches to neutralize TPI- a. Boost of anticancer pathway, b. Reprogramming/depletion of immune cells, and c. Inhibition of pro-cancer inflammation. However for an efficient neutralization, targeting one of them is not enough, hence a combinatorial approach is needed to combat TPI. To this end, in this thesis, various therapeutics were developed to neutralize TPI, where a. Dendritic cell (DC) based vaccine was developed to boost the anticancer pathway; b. Reprogramming/depletion of immune cells was accomplished by using CSF-1R inhibitor or a nano-formulation of recombinant IL-12; and c. Inhibition of pro-cancer inflammation was achieved by inhibiting induced PD-L1 expression. Specifically, this thesis describes three approaches of combinatorial immunotherapy for Cancer:

1. Development of tumor antigen presenting DC derived extracellular vesicles (Dex/DEV) as cancer vaccine and its synergistic effect with CSF-1R inhibitor, PLX-3397: Here we isolated Dex from bone marrow derived DCs which were activated with tumor antigen. We found that targeting CSF-1/CSF-1R signaling improves the *in vivo* efficacy of Dex where both Dex and PLX-3397 work in a collaborative manner by overcoming the disadvantages associated with monotherapies.

2. Use of DEVs as delivery carrier for IL-12: We encapsulated IL-12 into DEV and the nano-formulation (DEVIL) showed an improved plasma exposure, increased the tumor accumulation of IL-12, which eventually averted immunosuppressive microenvironment and systemic toxicity. This nano-formulation can be further explored to deliver other cytokines to enhance the efficacy while minimizing the dose-limiting toxicities.

3. Repurposing of Ponatinib as PD-L1 inhibitor: Here we have shown that Ponatinib can bind to PD-L1, inhibit PD-1/PD-L1 interaction, and delay the tumor growth by modulating antitumor immunity. Further studies revealed that Ponatinib can also inhibit the induced PD-L1 overexpression by regulating HIF-1 $\alpha$ .

4. Combinatorial approach: A combination treatment including Dex, PLX-3397, and Ponatinib was used to address all the three modalities for the neutralization of TPI. The combination treatment reduced the tumor growth by modulating the tumor microenvironment and systemic immunity which eventually resulted into a complete remission of tumors in murine colon carcinoma.

Similarly, for the prevention of Covid-19, several vaccines have been developed and got approved by FDA. However, most of the developed vaccine are mRNA or virus based which are associated with disadvantages such as poor stability and immunogenicity. Hence, to enhance the stability as

well as the immunogenicity, a delivery vehicle can be used which will also add to the therapeutic value. Therefore, this thesis also describes the harnessing of immune system for the treatment of Covid-19. In this study, the extracellular vesicles isolated from DCs were used as cell-free vaccine. Here we demonstrated that Spike protein delivered by DEVs enhances the immunogenicity of free protein and induces humoral immunity by producing neutralizing antibodies. A one-tenth Spike protein equivalent dose of DEVs was able to induce a comparable level of humoral and cellular immunity.

## सार

इम्यूनोथेरेपी एक जैविक चिकित्सा है जो उन कोशिकाओं को लक्षित करने, पहचानने और मारने के लिए प्रतिरक्षा प्रणाली का दोहन करती है जो या तो रूपांतरित या संक्रमित होती हैं। प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया को सक्रिय करने के लिए कार्रवाई के तंत्र के आधार पर इम्यूनोथेरेपी को निष्क्रिय या सक्रिय में विभाजित किया जाता है। सक्रिय इम्यूनोथेरेपी का उद्देश्य किसी भी बीमारी या संक्रामक एजेंटों के खिलाफ मेजबान प्रतिरक्षा को प्रेरित करना है। आमतौर पर उपयोग किए जाने वाले कुछ सक्रिय इम्यूनोथेरेपी टीके, साइटोकिन्स आदि हैं। इसके अलावा, निष्क्रिय इम्यूनोथेरेपी में संक्रमित या कैंसर कोशिकाओं को लक्षित करने के लिए टी-सेल और मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (एमएबी) जैसे प्रतिरक्षा प्रणाली घटकों का प्रशासन शामिल होता है। टीके सहित विभिन्न इम्यूनोथेरेपी दृष्टिकोणों का उपयोग सफलतापूर्वक कैंसर के उपचार और कोविड -19 जैसे संक्रामक रोगों के लिए किया गया है।

क्लीनिक या प्रीक्लिनिकल मॉडल में इम्यूनोथेरेपी की विभिन्न रणनीतियों के उपयोग के बावजूद, कैंसर से संबंधित मृत्यु दर दुनिया भर में मृत्यु के प्रमुख कारणों में से एक है। अधिकांश उपचार की विफलता पुरानी सूजन (टीपीआई) को बढ़ावा देने वाले ट्यूमर से जुड़ी है जो घातक कोशिकाओं के विकास और मेटास्टेसिस का समर्थन करती है। कैंसर और सूजन के बीच दिलचस्प संबंध के कारण, टीपीआई का बेअसर करना अधिक कुशल एंटीकैंसर उपचार के लिए एक प्रख्यात दृष्टिकोण लगता है। Tpi- a को बेअसर करने के लिए अलग-अलग दृष्टिकोण हैं। एंटीकैंसर मार्ग का बूस्ट, बी। प्रतिरक्षा कोशिकाओं की पुनरावृत्ति/कमी, और सी। प्रो-कैंसर सूजन का निषेध। हालांकि एक कुशल तटस्थता के लिए, उनमें से एक को लक्षित करना पर्याप्त नहीं है, इसलिए टीपीआई से निपटने के लिए एक कॉम्बिनेटरियल दृष्टिकोण की आवश्यकता होती है। यह अंत करने के लिए, इस थीसिस में, टीपीआई को बेअसर करने के लिए विभिन्न चिकित्सीय विकसित किए गए थे, जहां ए। डेंड्रिटिक सेल (डीसी) आधारित वैक्सीन को एंटीकैंसर मार्ग को बढ़ावा देने के लिए विकसित किया गया

था; बी। CSF-1R अवरोधक या पुनः संयोजक IL-12 के एक नैनो-निर्माण का उपयोग करके प्रतिरक्षा कोशिकाओं की पुनरावृत्ति/कमी को पूरा किया गया था; और सी। प्रेरित पीडी-एल 1 अभिव्यक्ति को बाधित करके प्रो-कैंसर सूजन का निषेध प्राप्त किया गया था। विशेष रूप से, यह थीसिस कैंसर के लिए कॉम्बिनेटरियल इम्यूनोथेरेपी के तीन दृष्टिकोणों का वर्णन करता है:

1. ट्यूमर एंटीजन का विकास डीसी व्युत्पन्न बाह्य पुटिकाओं (डेक्स/देव) को कैंसर वैक्सीन के रूप में प्रस्तुत करता है और सीएसएफ -1 आर अवरोधक, पीएलएक्स -3397 के साथ इसके सहक्रियात्मक प्रभाव अस्थि मज्जा व्युत्पन्न डीसी से जो ट्यूमर एंटीजन के साथ सक्रिय थे। हमने पाया कि CSF-1/CSF-1R सिग्नलिंग को लक्षित करने से DEX की विवो प्रभावकारिता में सुधार होता है, जहां DEX और PLX-3397 दोनों मोनोथैरेपी से जुड़े नुकसान पर काबू पाने के द्वारा सहयोगी तरीके से काम करते हैं।

2. IL-12 के लिए डिलीवरी वाहक के रूप में DEVs का उपयोग: हमने IL-12 को DEV में शामिल किया और नैनो-फॉर्मूलेशन (डेविल) ने एक बेहतर प्लाज्मा एक्सपोजर दिखाया, IL-12 के ट्यूमर संचय को बढ़ाया, जो अंततः इम्यूनोसप्रेसिव माइक्रोएन्वायरमेंट और प्रणालीगत को औसत करता है। विषाक्तता। खुराक-सीमित विषाक्तता को कम करते हुए प्रभावकारिता को बढ़ाने के लिए अन्य साइटोकिन्स को वितरित करने के लिए इस नैनो-फॉर्मूलेशन को आगे खोजा जा सकता है।

3. पीडी-एल 1 अवरोधक के रूप में पॉटिनिब को पुनः पेश करना: यहां हमने दिखाया है कि पॉटिनिब पीडी-एल 1 को बांध सकता है, पीडी -1/पीडी-एल 1 इंटरैक्शन को रोक सकता है, और एंटीट्यूमर प्रतिरक्षा को संशोधित करके ट्यूमर के विकास में देरी कर सकता है। आगे के अध्ययनों से पता चला है कि पॉटिनिब HIF-1 $\alpha$  को विनियमित करके प्रेरित PD-L1 ओवरएक्सप्रेशन को भी रोक सकता है।

4. कॉम्बिनेटरियल दृष्टिकोण: DEX, PLX-3397, और Ponatinib सहित एक संयोजन उपचार का उपयोग TPI के तटस्थता के लिए सभी तीन तौर-तरीकों को संबोधित करने के लिए किया गया था। संयोजन उपचार ने ट्यूमर माइक्रोएन्वायरमेंट और प्रणालीगत प्रतिरक्षा को संशोधित करके ट्यूमर के विकास को कम कर दिया, जो अंततः मरीन कोलोन कार्सिनोमा में ट्यूमर की पूरी छूट के परिणामस्वरूप हुआ।

इसी तरह, COVID-19 की रोकथाम के लिए, कई टीके विकसित किए गए हैं और FDA द्वारा अनुमोदित किया गया है। हालांकि, अधिकांश विकसित वैक्सीन mRNA या वायरस आधारित होते हैं जो खराब स्थिरता और इम्युनोजेनेसिटी जैसे नुकसान से जुड़े होते हैं। इसलिए, स्थिरता को बढ़ाने के साथ-साथ इम्युनोजेनेसिटी को भी बढ़ाने के लिए, एक डिलीवरी वाहन का उपयोग किया जा सकता है जो चिकित्सीय मूल्य में भी जोड़ देगा। इसलिए, यह थीसिस COVID-19 के उपचार के लिए प्रतिरक्षा प्रणाली के दोहन का भी वर्णन करता है। इस अध्ययन में, डीसी से अलग किए गए बाह्य पुटिकाओं को सेल-मुक्त वैक्सीन के रूप में उपयोग किया गया था। यहां हमने प्रदर्शित किया कि देवों द्वारा वितरित स्पाइक प्रोटीन मुक्त प्रोटीन की प्रतिरक्षा को बढ़ाता है और एंटीबॉडी को बेअसर करके हास्य प्रतिरक्षा को प्रेरित करता है। देवों की एक-दसवीं स्पाइक प्रोटीन समतुल्य खुराक एक तुलनीय स्तर के हास्य और सेलुलर प्रतिरक्षा को प्रेरित करने में सक्षम थी।