



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Mechanisms of melanoma-targeting antibody therapy in mice**

Benonisson, H.

### **Citation**

Benonisson, H. (2019, November 19). *Mechanisms of melanoma-targeting antibody therapy in mice*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80688>

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/1887/80688>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/80688> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Benonisson, H.

**Title:** Mechanisms of melanoma-targeting antibody therapy in mice

**Issue Date:** 2019-11-19

**CHAPTER 7**



Nederlandse samenvatting  
Summary  
Curriculum vitae  
Acknowledgement  
List of publication



## Samenvatting in het Nederlands

Eind jaren negentig van de vorige eeuw werden de eerste antistoffen die aan eiwitten op het oppervlakte van tumorcellen (tumor antigenen) kunnen binden, toegelaten voor gebruik in de kliniek om lymfomen en borstkanker te bestrijden. De tumorantigenen waren zodanig gekozen dat binding van het antistof aan de tumorcel de groei van die cel remt ofwel de cel direct doodt. Meer recent is echter duidelijk geworden dat tumor specifieke antistoffen ook cellen van onze afweer kunnen activeren wat een substantiële bijdrage kan leveren aan het therapeutische effect van de antistoffen. Antistoffen bestaan uit een variabel uniek deel dat aan het antigeen bindt en een constant deel (Fc domein) dat kan binden aan receptoren (Fc receptoren, FcR) op het oppervlak van verschillende soorten afweercellen zoals macrofagen, neutrofielen en NK cellen. Wanneer antilichamen die gebonden zijn aan een tumorcel met hun Fc domein aan FcR op afweercellen binden worden in die cellen mechanismen geactiveerd die de tumorcel kunnen doden. Een macrofaag zal de tumorcel opslokken (fagocyteren) en een NK cel zal (cytotoxische) stoffen uitscheiden die de tumorcel lek prikken. Dit is een natuurlijke afweerreactie die ook optreedt wanneer lichaamscellen worden geïnfecteerd door een virus.

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was om beter inzicht te verkrijgen in de rol van de verschillende afweercellen en de verschillende FcR op hun celoppervlak, in antistof therapie en te onderzoeken of de effectiviteit van de door de antistoffen geactiveerde tumor-dodende mechanismen kan worden verbeterd. Allereerst hebben we de rol van FcR in uiteenlopende afweerreacties onderzocht met behulp van een genetisch veranderde muis waarin alle FcR ontbraken. Nadat die rol in kaart was gebracht hebben we op tweeërlei wijzen antistof therapie in een muismodel voor pigmentcel tumoren bestudeerd. Enerzijds na vaccinatie met een virale vector die een tumor antigeen tot expressie bracht. Anderzijds door het inspuiten van een tumor specifieke antistof in combinatie met andere stoffen die de afweer activeren. Vaccinatie resulteerde in een antistof respons die goede bescherming bood tegen de uitgroei van de tumoren, welke afhankelijk was van FcR. Door gebruik te maken van genetisch veranderde muizen waarin een enkel type FcR ontbrak en door selectief bepaalde typen afweercellen uit de muis te verwijderen kon worden vastgesteld dat de FcγRI op macrofagen essentieel was voor de bescherming tegen uitgroei van deze pigmentcel tumoren. Echter reeds uitgegroeide tumoren waren ongevoelig voor deze vaccinatie therapie. De oorzaak hiervan is dat tumoren zijn ingebed in een micro-omgeving vol andere cellen die afweer reacties onderdrukken en tumorgroei bevorderen. Daardoor is de tumor niet vatbaar voor de aangemaakte antistoffen en kunnen antistoffen niet de juiste afweercellen met FcR activeren om de tumor te doden. Daarom hebben we onderzocht of het toedienen van stoffen die de afweer stimuleren de effectiviteit van antistof therapie kon verbeteren. We hebben kunnen aantonen dat het toedienen van een signaalstof, het cytokine IL-2, en een andere stof genaamd imiquimod, die receptoren op macrofagen kan stimuleren, het therapeutisch effect van antistoffen substantieel versterkt. Een groot percentage muizen met een uitgegroeide pigmentcel tumore was na behandeling met deze combinatie therapie volledig genezen. Het bleek dat imiquimod ervoor zorgt dat er meer actieve macrofagen met meer FcR op hun oppervlak in de micro-omgeving van de tumor aanwezig zijn. Deze

bevindingen openen de weg naar de ontwikkeling van effectievere antistof therapie voor de bestrijding van kanker. In de laatste studie werd onderzoek gedaan naar een antistof dat aan twee verschillende antigenen kan binden: het CD3 eiwit dat op killer cellen zit en daarnaast hetzelfde tumorantigeen dat in voorgaande studies werd gebruikt. Met zo'n bi-specifiek antistof is men in staat om de killer cellen te activeren in de microomgeving van de pigmentcel tumor. Er is nog weinig bekend over het mechanisme van afweerreacties die optreden met zo'n type behandeling. De meeste eerdere studies werden uitgevoerd in zogenaamde xenotransplantaatmodellen, waarin menselijke tumorcellen worden ingebracht bij muizen zonder goed functionerend afweersysteem. Die modellen zijn ongeschikt om werkingsmechanismen van zulke antistoffen te bestuderen, omdat afweercellen ontbreken in deze muizen. Toediening van het bi-specifieke antistof veroorzaakte onmiddellijk activatie van killer cellen in de tumor en deze activatie hield een aantal dagen aan. Secundaire influx van macrofagen en andere afweercellen trad 2-4 dagen na toediening op. Opvallende vinding bij dit onderzoek was dat de afweer geen langdurig geheugen ontwikkelde waarmee de muizen beschermd zouden zijn tegen terugkeer van de tumoren. Toekomstig onderzoek kan deze resultaten gebruiken om antistof-gebaseerde therapieën verder te verbeteren.

## Summary

At the end of the 1990s, the first antibodies that can bind proteins on the surface of tumor cells (tumor antigens) were approved for use in the clinic to combat lymphomas and breast cancer. The tumor antigens were chosen such that binding of the antibody to the tumor cell inhibits the growth of that cell or kills the cell directly. More recently, however, it has become clear that tumor-specific antibodies can also activate cells of our immune system, which can make a substantial contribution to the therapeutic effect of the antibodies.

Antibodies consist of a variable unique part that binds to the antigen and a constant part (Fc domain) that can bind to receptors (Fc receptors, FcR) on the surface of various types of immune cells such as macrophages, neutrophils and NK cells. When antibodies bound to a tumor cell bind with their Fc moiety to FcR on immune cells, mechanisms are activated in those cells that can kill the tumor cell. A macrophage will swallow the tumor cell (phagocytosis) and an NK cell will secrete (cytotoxic) substances that puncture the tumor cell. This is a natural immune response that also occurs when cells in the body are infected by a virus.

The aim of the research described in this thesis was to gain a better understanding of the role of the different immune cells and the different FcR on their cell surface, in antibody therapy and to

investigate whether the effectiveness of the tumor-killing mechanisms, activated by the antibodies, can be improved. First, we investigated the role of FcR in various immune responses using a genetically modified mouse, in which all FcR were missing. After defining that role, we studied antibody therapy in a mouse model for melanoma in two different ways: on the one hand, after vaccination using a viral vector that expressed a melanoma antigen, on the other hand, by injecting a melanoma-specific antibody in combination with other substances that activate the immune system. Vaccination resulted in an antibody response that offered good protection against melanoma outgrowth but not in the absence of FcR. By using mice lacking a single type of FcR and by selectively removing certain types of immune cells from the mice, it could be determined that FcγRI on macrophages was essential for the protection against outgrowth of a melanoma. However, vaccination had no effect in a mouse with an already established tumor. The reason for this is that tumors are embedded in a micro-environment full of other cells, including those that suppress immunity and those that support tumor cell growth. As a result, the tumor is not easily accessible for the antibody and antibodies cannot properly activate the right immune cells with FcR to kill the tumor. Therefore, we investigated whether adding substances that stimulate the immune system could improve the effectiveness of antibody therapy. We then demonstrated that administration of a survival substance, the cytokine IL-2, and the substance imiquimod that stimulates macrophages, improved the therapeutic effect of a melanoma-specific antibody. A large percentage of mice with a developed melanoma was completely cured after treatment with this combination therapy. It appeared that in the presence of imiquimod more active macrophages with more FcR on their surface were present in the micro-environment of the tumor. Moreover, killer immune cells were created, as depletion of CD8 T cells negated the effect. These findings open the way for the development of more effective antibody therapy for the fight against cancer and show as well the importance of initiating T cell response against tumors. In the last study, a bispecific antibody has been applied that binds the CD3 molecule on killer immune cells and at the same time the melanoma antigen used in the previous studies. We investigated the functional and mechanistic aspects of this antibody. Most prior functional studies on tumor and T cell targeting bispecific antibodies were done in xenograft models. Those models fail to recapitulate the normal mechanism which would occur in syngeneic models, due to the absence of mouse immune cells. Systemic administration of the bispecific antibody induced activation of T cells in the tumor that continued for several consecutive days. The secondary influx of macrophages, CD4 T and CD8 T cells occurred 2-4 days after administration. Even though T cells were needed for the initial efficacy, the treatment did not induce long term immune memory. Future research will benefit from these results aiming at the improvement of therapeutic efficacy of antibody-based therapy of cancer.



