

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20973> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Hooijkaas, Anna Irene

**Title:** Preclinical optimization of melanoma treatment

**Issue Date:** 2013-06-13

# ADDENDUM

NEDERLANDSE SAMENVATTING  
CURRICULUM VITAE  
LIST OF PUBLICATIONS



## INLEIDING

Melanoom is de meest agressieve vorm van huidkanker en ontstaat uit de pigment producerende cellen in de huid. De blootstelling van de huid aan de zon is een van de meest belangrijke oorzaken van melanoom, omdat de UV-straling in het licht leidt tot DNA schade. Melanoom komt wereldwijd steeds vaker voor en voor patiënten met uitzaaiingen waren er tot voor kort niet veel behandelingsmogelijkheden. Recentelijk zijn er echter twee middelen officieel goedgekeurd voor de behandeling van melanoom. Het eerste middel heet vemurafenib en is een zogeheten ‘gerichte’ therapie. Dit middel kan een foutief eiwit (genaamd BRAF<sup>V600E</sup>), wat alleen in de tumorcellen aanwezig is, remmen in zijn activiteit. Dit BRAF<sup>V600E</sup> eiwit zorgt er samen met andere foutieve eiwitten voor dat de tumorcellen blijven delen en niet sterven. Daarom is het belangrijk de werking van dit eiwit te verstoren. Het tweede middel heet ipilimumab en dit middel kan reacties van het immuunsysteem die gericht zijn tegen de tumor in hun werking versterken. Deze immuuntherapie zorgt ervoor dat T-cellen (onderdeel van het immuunsysteem) die tegen de tumor werken beter gaan functioneren door de functieremmende factor CTLA-4 op deze T-cellen te blokkeren.

## HUIDIGE PROBLEMEN BIJ DE ONTWIKKELING VAN MELANOOM BEHANDELINGEN

### Biomarkers

Op het moment worden meer en meer gerichte therapieën (zoals vemurafenib) en immuuntherapieën (zoals ipilimumab) ontwikkeld voor de behandeling van melanoom. Beide soorten behandelingen hebben hun eigen voor- en nadelen zoals besproken in *hoofdstuk 2*. Bij gerichte therapieën zie je vaak dat na start van de behandeling bij bijna alle patiënten de tumor eerst krimpt in grootte, maar dat deze na verloop van tijd (ongeveer na een half jaar) weer begint te groeien. De tumorcellen die ongevoelig zijn voor de behandeling krijgen dan de overhand. Bij immuuntherapieën is het vaak andersom: weinig patiënten reageren op de behandeling, maar zij die reageren blijven heel lang tumorvrij of stabiel. Aangezien de behandelingen vaak intensief zijn voor de patiënt en duur zijn, is het belangrijk factoren te vinden waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen patiënten die wel wat aan de behandeling hebben en zij waarbij dit niet zo is (en die dus niet behandeld zouden moeten worden). Deze factoren, die een behandelingsrespons kunnen voorspellen, worden ook wel biomarkers genoemd. Op het moment zijn er nog maar weinig biomarkers bekend voor de verschillende gerichte therapieën en immuuntherapieën. Met het oog op de soms hevige bijwerkingen en de hoge kosten van deze behandelingen, is het van belang dat er meer onderzoek wordt gedaan naar de identificatie van biomarkers.

## Veiligheid

Een ander probleem van zowel gerichte therapieën als immuuntherapieën is dat deze behandelingen vaak toxisch kunnen werken waardoor soms de veiligheid van de patiënt in het geding kan komen. Bij gerichte therapieën wordt vaak een eiwit geremd dat belangrijk is voor de overleving of deling van de tumorcel. Hierdoor kunnen de tumorcellen afgeremd of zelfs gedood worden. In veel gevallen is dit eiwit ook belangrijk voor het functioneren van normale cellen. Als gevolg hiervan worden vaak ook normale cellen in het lichaam met de gerichte therapie geremd. Afhankelijk van het eiwit dat geremd wordt kan dit leiden tot verschillende klachten zoals uitslag, hoofdpijn en diarree. Deze bijwerkingen zijn vaak zo ernstig van aard dat de dosering van de behandeling verlaagd moet worden. Helaas heeft het middel in deze lagere dosering vaak ook minder effect op de tumor.

Immuuntherapieën hebben vaak de ontwikkeling van auto-immuunziekten als bijwerking. Dit betekent dat het afweersysteem van de patiënt zich niet alleen tegen de tumor gaat richten, maar ook tegen normale cellen in het lichaam. De patiënt kan daardoor bijvoorbeeld colitis (afweerreactie tegen de eigen darmen resulterend in hevige diarree) of vitiligo (afweerreactie tegen de pigment producerende cellen resulterend in een witte huid) ontwikkelen. Deze autoimmuun bijwerkingen zijn gelukkig goed te behandelen zonder dat de antitumor werking van het medicijn wordt verminderd.

Bij een heel specifieke vorm van immuuntherapie, namelijk T-cel receptor (TCR) gentherapie, kan een speciaal soort bijwerking optreden. De T-cel receptor bevindt zich op het oppervlak van een T-cel en is verantwoordelijk voor het herkennen van 'foute' cellen zoals onder andere tumorcellen. De genetische informatie voor deze T-cel receptor kan geïsoleerd worden uit T-cellen die de tumor kunnen herkennen. Vervolgens kunnen deze genen ingebracht worden in andere T-cellen van een patiënt. Het gevolg hiervan is dat deze T-cellen opeens allemaal de tumor kunnen herkennen omdat ze allemaal (naast hun eigen T-cel receptor die ze al hadden) dezelfde extra antitumor T-cel receptor op hun oppervlakte hebben. Om te zorgen dat TCR gentherapie veilig is moet hetgeen de T-cel receptor herkent het liefst alleen op tumorcellen voorkomen. Op deze manier zullen normale cellen in het lichaam met rust gelaten worden door de T-cellen. Zij worden immers niet herkend door deze T-cellen met een nieuwe T-cel receptor. Wanneer normale cellen toch herkend kunnen worden door de T-cellen spreekt men van on-target toxiciteit en ontwikkelt er een autoimmuun reactie. Bij TCR gentherapie kan er echter ook sprake zijn van de ontwikkeling van zogenaamde off-target toxiciteit als bijwerking. In dit geval vormen delen van de nieuwe T-cel receptor samen met delen van de oude T-cel receptor (die er al was voordat de genen werden ingebracht) een unieke nieuwe T-cel receptor. Deze nieuwe extra T-cel receptor kan vaak normale cellen in het lichaam herkennen. Deze normale cellen worden dan aangevallen door de T-cellen en dit zou tot hevige toxiciteit kunnen leiden.

Om de patiënten veilig te kunnen behandelen met gerichte therapieën of immuuntherapieën is het van belang de bijwerkingen en het mechanisme daarachter goed in kaart te brengen om vervolgens op zoek te kunnen gaan naar oplossingen.

### Combinatiebehandelingen

Om de behandeling van melanoom verder te verbeteren kan men verschillende behandelingen met elkaar combineren. Door de grote hoeveelheid van gerichte therapieën en immuuntherapieën die momenteel in ontwikkeling zijn zal het moeilijk zijn om alle mogelijke therapiecombinaties uit te proberen in patiënten tijdens zogenaamde klinische studies. Het is echter wel mogelijk om zulke combinatiebehandelingen uit te proberen in muizen. Het is daarbij belangrijk dat het gebruikte muismodel tumoren kan ontwikkelen die lijken op een melanoom bij mensen. De tumoren moeten bijvoorbeeld dezelfde soort genetische veranderingen hebben zoals gezien bij menselijke melanomen en de muis moet beschikken over een goed immuunsysteem. In deze muismodellen kunnen vervolgens zowel gerichte therapieën als immuuntherapieën uitgetest worden. Vervolgens kan bepaald worden welke combinatiebehandelingen veelbelovend zijn en kan er gekeken worden waarom juist deze combinaties goed lijken te werken.



## OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ONDERWERPEN IN DIT PROEFSCHRIFT

Dit proefschrift beschrijft voor zowel gerichte therapieën als immuuntherapieën zaken die van belang zijn voor de identificatie van biomarkers, de toxiciteit en de veiligheid van de behandelingen en de potentiële effectiviteit van combinatiebehandelingen. De resultaten van de beschreven studies kunnen bijdragen aan de verbetering van de behandeling van melanoompatiënten in de toekomst.

### Onderzoek op het gebied van biomarkers

Naast het zoeken naar biomarkers die voorspellen of een patiënt baat zal hebben bij een zekere therapie, wordt er ook vaak gekeken of bepaalde factoren kunnen voorspellen wat de overlevingskans van een patiënt zal zijn. In *hoofdstuk 3* hebben wij gekeken of de aanwezigheid van het eiwit PD-L1 op tumorcellen een dergelijke voorspellende waarde heeft. PD-L1 op de tumorcellen kan inwerken op T-cellen en op die manier hun activiteit remmen. Zo proberen de tumorcellen te vermijden dat ze herkend en vervolgens vernietigd worden door de T-cellen. Wanneer tumorcellen PD-L1 op hun oppervlakte hebben proberen ze dus het immuunsysteem te ontwijken, wat vaak betekent dat er T-cellen aanwezig zijn die de tumor herkennen. Ons onderzoek heeft laten zien dat patiënten met PD-L1 op de tumorcellen een betere overlevingskans lijken te hebben dan zij die geen PD-L1 op hun tumor hebben. Dit effect was echter niet significant.

Later onderzoek heeft wel bevestigd dat de aanwezigheid van PD-L1 op de tumorcellen daadwerkelijk kan voorspellen of de patiënt een betere overlevingskans heeft.

In *hoofdstuk 3* hebben wij ook nog laten zien dat de aanwezigheid van biomarkers zoals PD-L1 verschilt per tumor. De eerste (primaire) tumor van een patiënt kan negatief zijn voor aanwezigheid van de biomarker, terwijl de uitzaaiingen van deze patiënt misschien wel positief zijn. Ook kan het uitmaken of er ingevroren tumormateriaal geanalyseerd wordt of materiaal dat geconserveerd is met behulp van formaline. Onze bevindingen laten zien dat door dit soort versturende factoren er voor sommige patiënten gedacht wordt dat een biomarker afwezig is terwijl de patiënt eigenlijk positief is voor de biomarker. Wij concluderen daarom dat het voor biomarker onderzoek belangrijk is om per patiënt meerdere tumoren te analyseren en goed te bepalen of het soort tumormateriaal (bevroren of chemisch geconserveerd) geschikt is om te kijken naar aanwezigheid van deze biomarker.

Het onderzoek naar biomarkers die voorspellen of een patiënt baat zal hebben bij gerichte therapie staat momenteel nog in de kinderschoenen. Wij verwachten dat het bepalen van de genetische veranderingen in de tumor van iedere patiënt zal helpen bij het identificeren van biomarkers die voorspellen of de tumor ongevoelig gaat worden voor de behandeling. Er is echter nog veel onderzoek nodig voordat het zover is.

### Onderzoek op het gebied van veiligheid van behandelingen

Zoals eerder besproken hebben veel van de immuuntherapieën de ontwikkeling van auto-immuunziekten als bijwerking. Wanneer TCR gentherapie gericht is op iets dat ook op de oppervlakte van normale cellen voorkomt, kan er zogeheten on-target toxiciteit optreden. Normale cellen in het lichaam worden dan herkend door de T-cellen en vervolgens vernietigd. Om dit te voorkomen is het belangrijk om voor ontwikkeling van de behandeling zeker te weten dat de T-cellen met de nieuwe T-cel receptor alleen de tumorcellen herkennen en geen normale cellen. In *hoofdstuk 4* hebben wij een dergelijke veiligheidsanalyse uitgevoerd. Wij wilden TCR gentherapie ontwikkelen gericht op het eiwit Nodal, dat vaak op de oppervlakte van melanoomcellen te vinden is. Tijdens onze studie ontdekten wij dat dit eiwit ook voorkomt op de oppervlakte van cellen in de nier. Dit zou betekenen dat TCR gentherapie gericht op Nodal zou kunnen leiden tot destructie van nierweefsel. De T-cellen met de nieuwe T-cel receptor die Nodal kan herkennen zouden dan namelijk niet alleen de tumorcellen aanvallen, maar ook de niercellen. Op basis van deze resultaten hebben wij besloten dat TCR gentherapie zich niet zou moeten richten op het eiwit Nodal. Het is namelijk belangrijk dat hetgeen waar de TCR gentherapie zich op richt niet aanwezig is op normale cellen in het lichaam. Voor Nodal was het aanvankelijk niet bekend dat dit eiwit ook voorkwam op normale cellen in het lichaam.

Behalve on-target toxiciteit kan TCR gentherapie ook leiden tot de besproken off-target toxiciteit. In *hoofdstuk 5* laten wij zien dat deze off-target toxiciteit inderdaad

kan voorkomen en dat dit fatale gevolgen kan hebben. In deze studie tonen wij aan dat delen van de nieuwe T-cel receptor samen met delen van de oude T-cel receptor (voor de gentherapie had de T-cel immers zelf ook al een T-cel receptor) een geheel nieuwe T-cel receptor kan vormen. De T-cellen met deze zogenaamde 'mixed dimer' T-cel receptor bleken normale cellen in bijvoorbeeld het beenmerg van een muis te kunnen herkennen. Als gevolg hiervan werden deze cellen vernietigd met fatale gevolgen. In dit hoofdstuk worden ook verschillende strategieën besproken waarmee de vorming van deze 'mixed dimer' T-cel receptoren voorkomen kan worden.

Gerichte therapieën leiden regelmatig tot bijwerkingen omdat deze behandelingen vaak belangrijke eiwitten remmen die behalve voor de tumor ook voor normale cellen van belang zijn. Remmers van het eiwit MEK kunnen het delen en overleven van tumorcellen tegengaan. Aangezien het eiwit MEK ook van belang is voor de normale cellen in de huid, leidt een behandeling met deze gerichte therapie vaak tot ernstige huidtoxiciteit. In *hoofdstuk 6* laten wij zien dat MEK-remmer behandeling van muizen met melanoom leidt tot een stop in de tumorgroei, maar ook tot de huidtoxiciteit. Het verlagen van de dosering van de behandeling leidt tot een vermindering van de huidtoxiciteit, maar het antitumor effect van de behandeling wordt dan ook minder. Wanneer de MEK-remmer behandeling wordt gecombineerd met vemurafenib behandeling, zien we dat deze huidtoxiciteit veel minder vaak en in veel minder ernstige mate voorkomt. De vemurafenib behandeling lijkt dus te beschermen tegen de huidtoxiciteit die vaak ontwikkelt wanneer MEK-remmers worden gebruikt. De resultaten van deze studie laten zien dat wanneer deze twee middelen samen worden gebruikt, de MEK-remmer in hogere doseringen kan worden gegeven dan normaal gebruikelijk. Dit leidt hoogstwaarschijnlijk tot een beter antitumor effect van de behandeling.

### Onderzoek op het gebied van combinatiebehandelingen

Om te bepalen welke combinaties van gerichte therapieën en immuuntherapieën veelbelovend zijn voor de behandeling van melanoom zijn goede muismodellen nodig. De melanomen die groeien in deze muizen moeten op menselijke melanomen lijken wat betreft de genetische veranderingen in de tumorcellen. Bovendien moet het muismodel over een functionerend immuunsysteem beschikken. In *hoofdstuk 7* beschrijven wij de ontwikkeling van een dergelijk muismodel, namelijk de Tyr::CreER<sup>T2</sup>;PTEN<sup>F/-</sup>;BRAF<sup>F-V600E/+</sup> muis. Muizen van deze soort kunnen melanomen ontwikkelen (op een door ons gekozen moment en lokatie) die lijken op het menselijke spoelcelvormige melanoom. In deze tumoren zijn twee belangrijke genetische veranderingen aanwezig die ook vaak bij menselijke melanomen worden gezien, namelijk de aanwezigheid van het BRAF<sup>V600E</sup> eiwit en het verlies van het PTEN eiwit. In deze muizen kan het effect van combinatiebehandelingen worden bestudeerd.

De combinatie van het op BRAF<sup>V600E</sup> gerichte medicijn vemurafenib en het T-cel stimulerende medicijn ipilimumab is veelbesproken aangezien dit twee behandelingen



zijn die officieel zijn goedgekeurd. Deze combinatiebehandeling kan worden uitgetest op het zojuist beschreven melanoom muismodel. In *hoofdstuk 8* hebben wij dit gedaan en hierbij zagen wij dat er geen behandelingssynergie was. Wanneer muizen behandeld werden met vemurafenib zagen wij dat er minder immuuncellen in de tumor aanwezig waren dan bij onbehandelde muizen. Dit bleef het geval, zelfs als wij de immuuntherapie ipilimumab toevoegden aan de behandeling. De combinatie van deze twee behandelingen lieten dan ook geen extra remmend effect op tumorgroei zien.

## CONCLUSIE

Het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift kan bijdragen aan de verbetering van de behandeling van melanoom vanwege de volgende redenen. Ten eerste laten wij zien dat bij biomarker onderzoek het van groot belang is meerdere tumoren in overweging te nemen en goed te bepalen of het soort tumormateriaal geschikt is voor het onderzoek. Ten tweede tonen wij aan dat het belangrijk is om een uitgebreide veiligheidsanalyse uit te voeren wanneer men TCR gentherapie ontwikkelt om uit te sluiten dat hetgeen waar de therapie zich tegen richt ook voorkomt op normale cellen. Ten derde hebben wij bewezen dat na TCR gentherapie T-cellen 'mixed dimer' T-cel receptoren kunnen hebben en vervolgens normale cellen in het lichaam kunnen aanvallen. Wij laten in onze studie zien dat er strategieën bestaan die deze vorm van toxiciteit kunnen tegengaan. Ten vierde demonstreren wij dat huidtoxiciteit als gevolg van behandeling met MEK-remmers kan worden tegengegaan door tegelijk een behandeling met vemurafenib toe te dienen. Dit betekent dat MEK-remmers in hogere (en waarschijnlijk effectievere) doseringen gegeven kunnen worden dan op het moment gebruikelijk is. Ten vijfde is het nu mogelijk het effect van vele verschillende combinatiebehandelingen te bestuderen door het ontwikkelen van een nieuw melanoom muismodel. Op deze manier kan weloverwogen worden besloten welke therapiecombinaties daadwerkelijk uitgeprobeerd moeten worden in patiënten. Tot slot hebben wij laten zien dat de combinatie van vemurafenib en ipilimumab behandeling mogelijk niet tot synergie zal leiden bij patiënten met het BRAF<sup>V600E</sup> eiwit en het verlies van het PTEN eiwit in hun melanoom. Verder preklinisch onderzoek zoals dat beschreven in dit proefschrift zal leiden tot verdere verbeteringen van de behandeling van melanoom.

