



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Targeting the tumor-draining area : local immunotherapy and its effect on the systemic T cell response

Herbert-Fransen, M.F.

### Citation

Herbert-Fransen, M. F. (2012, April 17). *Targeting the tumor-draining area : local immunotherapy and its effect on the systemic T cell response*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18692>

Version: Corrected 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/1887/18692>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18692> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Herbert-Fransen, Marieke Fernande

**Title:** Targeting the tumor-draining area : local immunotherapy and its effect on the systemic T cell response

**Date:** 2012-04-17

## Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

Ons afweersysteem is ontstaan om ons te beschermen tegen ziekteverwekkers zoals virussen en bacteriën. Het bestaat uit een groot aantal verschillende soorten cellen met elk een specifieke functie, die moeten samenwerken om ziekteverwekkers te kunnen herkennen en opruimen. Het moeilijkste van dit proces voor de afweercellen is onderscheid te maken tussen gezond weefsel en onschuldige indringers (zoals bacteriën in je darmen of deeltjes uit je voeding) en ziekteverwekkers. Als het afweersysteem gaat reageren tegen gezond weefsel kan auto-immuniteit ontstaan, en als het afweersysteem reageert tegen onschuldige indringers, dan kunnen allergieën ontstaan. Om het onderscheid te kunnen maken tussen gezond/onschuldig en ziek moeten afweercellen goed communiceren. Met een strak gereguleerde balans tussen activeren en afremmen moeten ze tot de juiste actie overgaan.

Sinds een tijd weten we dat het afweersysteem ook belangrijk is bij kanker. Bij patiënten die een verminderde weerstand hebben door medicatie (bijvoorbeeld na transplantatie) of ziekte (bijvoorbeeld bij AIDS patiënten) ontstaan sneller tumoren. In veel kankerpatiënten en proefdiermodellen van kanker zijn bewijzen gevonden van een afweerrespons tegen de kankercellen. De afweerrespons is niet sterk genoeg om tumoren volledig op te kunnen ruimen. Dit komt voor een groot deel door de strakke regulering van de balans van het afweersysteem. Doordat kankercellen lichaamseigen cellen zijn en er geen sprake is van duidelijke schade zoals dat bij virale of bacteriële infectie wel het geval is, blijft de balans van het afweersysteem op afremmen in plaats van activeren. In dit proefschrift wordt onderzoek beschreven naar therapieën om de afweerrespons tegen tumoren te activeren, zonder daarbij een te groot risico te lopen op het opwekken van auto-immuniteit.

Een bepaald soort cel van het afweersysteem, de dendritische cel (DC), fungeert als verkenners in het lichaam. Deze cellen bevinden zich op alle plaatsen waar indringers het lichaam zouden kunnen binnendringen. Een DC speurt continue de omgeving af en verzamelt materiaal door bijvoorbeeld dode cellen op te nemen. Als er veel dode cellen en schade zijn, bijvoorbeeld bij een infectie, dan worden DCs geactiveerd waarna ze migreren naar de dichtstbijzijnde lymfeklier. Daar bevinden zich vele andere soorten afweercellen die met de DC kunnen communiceren. De DC laat kleine stukjes van het materiaal dat hij heeft opgenomen aan zijn celoppervlakte zien. Daarmee laat de DC aan de afweercellen in de lymfeklier zien wat er in het lichaam aan de hand is. Meerdere cellen scannen de DCs; wanneer ze iets herkennen, gaan ze tot actie over. Een bepaald soort cel van het afweersysteem, de CD8 T cel, kan, als hij het juiste signaal van

de DC heeft gekregen, overgaan tot het doden van geïnfecteerde cellen. Elke CD8 T cel herkent iets anders; pas als de CD8 T cel in contact is gekomen met een geactiveerde DC die dat specifieke stukje (antigeen) heeft gepresenteerd, en daarbij nog enkele activerende signalen heeft gegeven, gaat deze cel heel hard delen. Als er voldoende cellen zijn die allemaal dat specifieke stukje antigeen herkennen, gaan de CD8 T cellen door het lichaam op zoek naar cellen die ook dat antigeen hebben en maken deze cellen dood. Die stukjes antigeen kunnen afkomstig zijn van virussen of bacteriën, maar dat kunnen ook stukjes materiaal van kankercellen zijn.

Als alle cellen die de stukjes antigeen hebben zijn opgeruimd, gaat het grootste deel van de CD8 T cellen dood. Een klein deel blijft leven en wordt geheugencellen. Deze geheugencellen reageren veel sneller wanneer eenzelfde virus/bacterie nogmaals het lichaam binnendringt. Dit is het principe van immuniteit tegen bepaalde ziekte en ook het principe van vaccinatie. Door bewust afweercellen te activeren tegen stukjes van bepaalde virussen of bacteriën kunnen we zorgen dat er geheugencellen ontstaan, zodat ons afweersysteem adequaat en snel kan reageren als we later met dezelfde virussen of bacteriën in aanraking komen.

## **Hoofdstuk 2: Lokale toediening van anti-CD40 activerend antilichaam in een langzame afgifte depot geeft goede tumor opruiming en sterk verlaagde toxiciteit**

In hoofdstuk 2 wordt een manier beschreven om de CD8 T cellen die kankercellen kunnen herkennen te activeren, zonder daarbij het hele afweersysteem te activeren. In een proefdiermodel laten wij zien dat er in de poortwachter lymfeklier, de lymfeklier die het dichtst bij de tumor ligt, tumor-specifieke CD8 T cellen zijn. Deze tumor-specifieke CD8 T cellen zijn niet voldoende geactiveerd en hebben niet genoeg gedeeld om de tumor op te kunnen ruimen. In eerdere onderzoeken is al aangetoond dat als je deze muizen injecteert met anti-CD40 activerend antilichaam, de CD8 T cellen wel voldoende worden geactiveerd en de tumor gaan opruimen. Dit werkt als volgt; de anti-CD40 activerende antilichamen binden aan het molecuul CD40 op de DCs, en geven een activerend signaal. In de poortwachter lymfeklier zitten DCs die stukjes van de tumorcellen presenteren, en als deze door de anti-CD40 activerende antilichaam worden geactiveerd, kunnen ze op hun beurt de tumorspecifieke CD8 T cellen activeren. Het probleem met deze therapie is dat het anti-CD40 activerende antilichaam in het hele lichaam alle DCs activeert, en nog een heleboel andere afweer cellen, die ook het molecuul CD40 hebben. Dit geeft onnodige schade en een verhoogd risico op auto-immuun ziektes. Ons onderzoek toont aan dat als je het anti-CD40 antilichaam inspuit dicht bij de tumor en de poortwachter lymfeklier, in een

emulsie waaruit het antilichaam langzaam vrijkomt, de tumorspecifieke CD8 T cellen door de DCs in de poortwachter lymfeklier worden geactiveerd, maar dat er niet zoveel van het antilichaam in de rest van het lichaam terecht komt dat alle immuuncellen geactiveerd raken. De bijwerkingen van deze manier van toediening zijn veel lager dan wanneer het anti-CD40 antilichaam in het bloed wordt ingespoten. Daarnaast is veel minder van het antilichaam nodig bij lokale toediening voor een goed effect. Bovendien, doordat de tumor-specifieke CD8 T cellen in de lymfeklier goed worden geactiveerd en gaan delen, kunnen ze daarna in het hele lichaam op zoek gaan naar tumorcellen. Eventuele uitzaaiingen kunnen dan wel worden opgeruimd door de CD8 T cellen, ook als het anti-CD40 antilichaam er niet bij in de buurt komt.

### **Hoofdstuk 3: Lokale toediening van CTLA-4 blokkerend antilichaam in een langzame afgifte depot geeft goede tumor opruiming via activering van CD8 T cellen**

In hoofdstuk 3 wordt dezelfde lokale toediening in een emulsie toegepast met CTLA-4 blokkerend antilichaam. CTLA-4 is een molecuul op de oppervlakte van T cellen dat betrokken is bij de regulering van activatie van T cellen. CTLA-4 geeft een remmend signaal aan T cellen om responsen tegen lichaamseigen cellen te voorkomen. Het blokkeren van CTLA-4 wordt gebruikt om bij tumorspecifieke T cellen die remmende werking op te heffen. Dit antilichaam is onlangs goedgekeurd in de Verenigde Staten voor gebruik in patiënten met vergevorderde huidkanker. Bij deze patiënten wordt het blokkerende antilichaam toegediend in het bloed. Er zijn goede resultaten geboekt met remming van de groei van tumoren en activering van de T cellen tegen tumoren. Een groot deel van de patiënten die wordt behandeld met dit antilichaam krijgt ook last van auto-immuun gerelateerde bijwerkingen, zoals ernstige diarree en huidontstekingen. Dit is logisch omdat het blokkeren van CTLA-4 niet alleen bij tumor-specifieke T cellen gebeurt, maar bij alle T cellen. Wij laten zien dat voor het CTLA-4 blokkerende antilichaam hetzelfde geldt als voor het anti-CD40 activerende antilichaam. Als je het dicht bij de tumor en de poortwachter lymfeklier spuit in een emulsie die voor langzame afgifte zorgt, krijg je met een veel lagere dosis van het antilichaam een even goed effect op tumoren als bij een toediening van een hoge dosis in het bloed. Dit geeft minder bijwerkingen en verlaagt het risico op auto-immuniteit.

### **Hoofdstuk 4: De invloed van een lokale geactiveerde lymfeklier op de ontwikkeling van de CD8 T cellen**

In hoofdstuk 4 wordt beschreven wat de bijdrage is van het geactiveerde milieu van een lymfeklier in een afweerrespons. Tijdens een infectie wordt de lokale lymfeklier geactiveerd. Door een sterke influx van cellen zwelt de lymfeklier op en worden allerlei activerende stoffen uitgescheiden. In ons onderzoek hebben wij een methode opgezet waarmee we precies de invloed van deze geactiveerde omgeving kunnen bepalen. CD8 T cellen worden kort in kwekschalen geactiveerd onder precies dezelfde omstandigheden, waarna ze in muizen met of muizen zonder een geactiveerde lymfeklier worden gespoten. De cellen worden daarna op verschillende momenten geanalyseerd op aantallen, capaciteit tot het doden van hun doelwit cellen en ontwikkeling tot geheugencellen. De resultaten laten zien dat de CD8 T cellen in muizen met een geactiveerde lymfeklier voordeel hebben ten opzichte van de T cellen in muizen zonder geactiveerde lymfeklier. Dit uit zich vooral in een grotere hoeveelheid geheugencellen en een snellere en sterkere reactie van deze geheugencellen op een tweede infectie.

### **Hoofdstuk 5: Een emulsie van olie in water is geschikter om antilichamen voor tumor therapie langzaam af te geven dan microscopisch kleine bolletjes opgebouwd uit dextran-suikers**

In hoofdstuk 5 wordt onderzoek beschreven waarin twee manieren om antilichamen langzaam af te geven in het lichaam met elkaar worden vergeleken. In hoofdstuk 2 en 3 wordt beschreven dat lokale toediening van anti-CD40 activerend antilichaam en CTLA-4 blokkerend antilichaam in een langzame afgifte formulering een goede tumor-specifieke T cel activatie geeft met veel minder bijwerkingen. De langzame afgifte formulering die wij in de studies beschreven in hoofdstuk 2 en 3 gebruikten is Montanide, een olie in water emulsie. Hier vergeleken wij Montanide met een nieuwe methode, namelijk microscopisch kleine bolletjes gemaakt van dextran-suikers (dextranbolletjes), waarin het antilichaam is verpakt. Deze bolletjes vallen in het lichaam vanzelf langzaam uit elkaar waardoor het antilichaam vrij komt. De snelheid van uit elkaar vallen kan worden bepaald door de manier waarop de bolletjes worden gemaakt, met meer of minder water in het mengsel. Wij beschrijven dat de langzame afgifte van anti-CD40 antilichaam uit de dextran-bolletjes goed werkt; zelfs bij lage snelheid van uit elkaar vallen worden nog steeds tumor-specifieke T cellen geactiveerd. De bijwerkingen van de therapie met deze dextranbolletjes zijn zelfs nog minder dan bij de montanide-emulsie. Helaas blijken de dextranbolletjes toch minder geschikt voor gebruik als tumor-therapie aangezien de tumoren sneller gingen groeien van de dextran-bolletjes die er dichtbij werden gespoten. Het feit dat de langzame afgifte efficiënt is, is dus nog geen maat voor de goede werking bij tumor-therapie. Dit onderzoek geeft aan dat Montanide emulsie meer geschikt

is voor tumor-therapie dan dextran-bolletjes.

### **Hoofstuk 6: Discussie**

In het laatste hoofdstuk worden alle onderdelen van het proefschrift samengevat en bediscussieerd aan de hand van vergelijkbare studies uit de literatuur. In een opinie artikel bespreek ik onderzoek waarover de afgelopen jaren is gepubliceerd. Ik gebruik die publicaties, samen met onze eigen bevindingen, om de stelling te onderbouwen dat immuun-activerende therapie van tumoren het beste gericht kan worden op de poortwachter lymfeklier in plaats van in het bloed gespoten te worden.

