

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33005> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Vos van Steenwijk, P.J. de

**Title:** Immunology and immunotherapy of high grade cervical lesions and cancer

**Issue Date:** 2015-05-19

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Immunologie en Immunotherapie van premaligne afwijkingen en kanker van de baarmoederhals

#### *Baarmoederhalskanker*

Baarmoederhalskanker (het cervixcarcinoom) wordt veroorzaakt door een virus, het hu-maan papillomavirus (HPV). Er zijn meer dan 100 verschillende soorten HPV ingedeeld in laag-risico (niet-oncogene) virussen en hoog-risico (oncogene) virussen. Voordat er sprake is van een maligniteit, kan er jaren lang sprake zijn van premaligne veranderingen in het epitheel van de baarmoedermond, beter bekend als Cervicale Intra-epitheliale Neoplasie (CIN). HPV is de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoening, ongeveer 80% van alle vrouwen zal ooit geïnfecteerd raken. De meerderheid van de infecties zal binnen twee jaar geklaard worden, echter in 10% van de gevallen zal het virus persisteren, met kans op het ontstaan van CIN. Het HPV brengt twee oncogene eiwitten tot expressie (E6 en E7). Deze eiwitten, die aanwezig zijn in alle hooggradige CIN (CIN II/III) en kankercellen, zorgen voor een maligne transformatie van de cellen, maar kunnen ook als markers op de cellen gebruikt worden om de kwaadaardige cellen te herkennen tussen de omliggende gezonde cellen.

#### *Immunologie*

Het immuunsysteem beschermt het lichaam tegen virussen, bacteriën en parasieten, maar ruimt ook afvalstoffen en zieke cellen (zoals kankercellen) op. Keratinocyten (epitheel cellen) zijn de eerstelijns verdediging tegen indringers doordat ze receptoren tot expressie brengen (Toll-like receptoren, TLR) die pathogenen, zoals HPV, kunnen herkennen. Als ze in aanraking komen met een pathogeen wordt de TLR geactiveerd, wat een cascade in de cel teweegbrengt, met als doel de productie van allerlei afweer stimulerende cytokinen (b.v. GM-CSF, IL-1b, TNF-a, IL-10, IL-12) en chemokinen die zorgen voor het aantrekken van antigeen-presenterende cellen (APC's) o.a. Langerhans cellen (LC), Dendritische cellen (DC's) en Macrofagen. De APC's reageren op signalen in de omgeving en zullen daardoor op een bepaalde manier differentiëren en migreren naar de lymfeklieren, om daar de antigenen te presenteren aan naïeve T-cellen (lymfocyten). Afhankelijk van co-stimuloire of inhibitoire moleculen (bv IL-12 vs. IL-10) zal een T-cel reactie geïnduceerd worden bestaande uit CD8+ cytotoxische T-cellen (CTLs), CD4+ helper T-cellen (Th cellen) en/ of CD25+FoxP3+ regulatoire T-cellen.

Het belang van een goede T-cel respons in de verdediging tegen HPV, wordt evident bij immuun gecompromeerde personen, waar een hoge incidentie van CIN II/III en baarmoederhalskanker wordt gevonden. In de circulatie van gezonde individuen wordt vaak een breed HPV specifiek Th1, Th2 en CTL immuun respons gevonden wat gepaard gaat

met de productie van pro-inflammatoire cytokinen (bv Interferon (IFN- $\gamma$ )). Een breed HPV-specifiek respons lijkt essentieel om het virus onder controle te krijgen. Het falen van het immuunsysteem om HPV onder controle te krijgen wordt gezien in patiënten met baarmoederhalskanker, waarbij maar in een derde van de patiënten een systemische HPV-specifieke T-cel respons tegen de HPV E6 en E7 wordt gevonden. Een minderheid van die responsen gaat gepaard met de productie van IFN- $\gamma$  en word er voornamelijk Th2 cellen, niet-gepolariseerde cellen en regulatoire T cellen gevonden.

In de loop van een HPV infectie zijn er meerdere mechanismen die een rol lijken te spelen in het ontwijken van het immuunsysteem. Zo wordt in keratinocyten de cascade na activatie van TLR onderdrukt. Het HLA expressie (humaan leukocytenantigen, belangrijk voor de herkenning van kanker cellen door, en de activatie van lymfocyten) wordt onderdrukt en er worden immunosuppressieve cytokinen geproduceerd. Regulatoire T-cellen worden geactiveerd terwijl Th cellen en CTLs dysfunctioneel worden gemaakt door de expressie van co-inhibitoire moleculen. Tot slot worden de APC's ondermijnd in hun functie.

### **Immunotherapie bij kanker**

Het falen van het immuunsysteem kan dus leiden tot het ontstaan van kanker. Logischerwijs is het herstellen van een goed immuun profiel één van de belangrijke doelen van immunotherapeutische strategieën. Verschillende therapieën zijn in de loop van de jaren ontwikkeld, vaak met gelimiteerd succes, waarbij maar een kleine gedeelte van de patiënten baat lijkt te hebben. Dit zou dit kunnen liggen aan het feit dat er meerdere mechanismen betrokken bij het ontwijken van de tumor aan het immuunsysteem (tumor escape). Een succes ligt dan waarschijnlijk ook in een gecombineerde aanpak waarbij meerdere therapeutische strategieën worden gecombineerd. Enerzijds moet het immuun-gemedieerd tumorvernietiging bevorderd worden en anderzijds moet het tumor-gemedieerde immuun suppressie uitgeschakeld worden. Er zijn grofweg drie immunotherapeutische strategieën: therapeutisch vaccineren, antilichaam- of cytokinetherapie en adoptieve T cel therapie. De verwachting is dat het aantal strategieën in de komende jaren sterk zal toenemen.

### **Dit proefschrift**

In de zoektocht naar effectieve en innovatieve immunotherapeutische behandelingen van baarmoederhalskanker, is het essentieel om meer te weten over de bestaande anti-tumorale immuniteit in het bloed en in de tumor zelf. Dit proefschrift draagt bij aan lopend onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het ontstaan van baarmoederhalskanker met nadruk op het lokale tumor micromilieu en een verdere ontwikkeling van een therapeutisch vaccin.

In Hoofdstuk 2 laten we zien dat het falen van het immuunsysteem reeds in de premaligne fase begint. Slechts een kleine minderheid van de patiënten met HPV16 positieve CIN II/

III laesies, heeft een IFN- $\gamma$  geassocieerde immuunrespons tegen HPV16. Dysfunctionele proliferatieve responsen worden vaker gevonden bij patiënten met persisterende infectie na chirurgische behandeling. Ook hebben we HPV16 specifieke regulatorische T-cellen kunnen kweken uit CINII/III laesies. Dit onderzoek laat zien dat er ruimte is voor immunotherapie bij premaligne afwijkingen van de baarmoedermonden en het heeft de basis gelegd voor het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin voor patiënten met CIN.

Hoofdstuk 3 beschrijft een uitgebreide onderzoek naar de lokale HPV16 E6 en E7 specifieke T-cellen, gekweekt uit baarmoederhalstumoren en de drainerende lymfeklieren. Grote repertoires aan HPV specifieke T-cellen kunnen aanwezig zijn die ingedeeld kunnen worden in verschillende cytokine profielen. De cellen zijn goed te geïsoleerd en te kweken en zouden gebruikt kunnen worden in adoptieve T-cel therapie voor patiënten met baarmoederhalskanker.

Een tumor is omgeven door een stroma opgebouwd uit o.a. fibroblasten, bloed- en lymfevaten en immuun cellen. Er bestaat een precare balans tussen tumor cellen, infiltrerende immuun cellen en de cytokinen die geproduceerd worden. Dit wordt het tumor micromilieu genoemd. In hoofdstuk 4 brengen wij het tumor micromilieu verder in kaart bij patiënten met baarmoederhalskanker. Wij laten een belangrijke rol zien voor myeloïde cellen. Intra-epitheliale CD14+CD33-CD163- myeloïde cellen worden geassocieerd met een sterkte intra-epitheliale toename van T cellen en een verbeterde overleving van de patiënten. Tevens brengen we 40 bekende immuun parameters van het tumor micromilieu in kaart, waarbij we verschillende immuun profielen vinden, die geassocieerd zijn met de overleving van patiënten. In hoofdstuk 5 gaan we dieper in op het tumor micromilieu en laten we zien hoe baarmoederhalskanker cellen de myeloïde cellen kunnen beïnvloeden door de differentiatie van monocytten tot DC te verstoren tot anti-inflammatoire macrofagen (M2). Wij identificeren twee cytokinen, geproduceerd door de kankercellen, die hiervoor verantwoordelijk zijn (PgE2 en Il-6). Wij zijn vervolgens op zoek gegaan naar manieren om dit proces weer terug te draaien en laten zien dat dit bereikt kan worden door het blokkeren van PgE2 en IL-6, maar ook door CD40 activatie door interactie met geactiveerde T cellen. Bij patiënten met baarmoederhalskanker zou het blokkeren van Il-6 en/of PgE2 (door COX-inhibitoren) samen met de inductie van sterk geactiveerde T cellen (door bv. vaccinatie) kunnen leiden tot een veranderde pro-inflammatoir tumor micromilieu. In de laatste twee hoofdstukken beschrijven we twee klinische studies, waarin een HPV16 synthetisch lange peptide (SLP) vaccin in een Montanide adjuvant, getest wordt bij patiënten met CIN. Hoofdstuk 6 beschrijft een placebo gecontroleerde fase II studie waarin het HPV16 SLP wordt getest bij patiënten met een CIN II/III. Het doel van de studie was de immunititeit van het vaccin in deze patiëntengroep, de capaciteit van het vaccin om T cellen te laten migreren naar de laesie en de klaring van het virus. Vaccinatie van patiënten met CIN II/III liet een sterke

toename in Th1 HPV16 specifieke immuniteit zien, echter stuitte het onderzoek op inclusie problemen en onacceptabele bijwerkingen ter plekke van de vaccinatie plek. Hoofdstuk 7 onderzoekt de capaciteit van een lage dosering van het HPV16 SLP om een HPV16 specifieke response te initiëren in patiënten met een afwijkend uitstrijkje of CIN I. Ook wilden we de lange termijn respons en de noodzaak tot een herhaling van het vaccin na 1 jaar te bekijken. Aan de hand dit onderzoek kunnen we concluderen dat twee lage doseringen van het HPV16 SLP een sterke immuunrespons kan induceren en dat deze respons langer dan een jaar intact blijft. Het revaccineren na 1 jaar initieerde voornamelijk een Th2 respons. Om het HPV16 SLP vaccin verder te ontwikkelen in deze patiënten groep is een reductie in de lokale bijwerkingen essentieel. Lopend onderzoek zal moeten uitwijzen of het intradermaal injecteren van het HPV16 SLP, eventueel geconjugeerd aan TLR2 zonder Montanide, de bijwerkingen kan verminderen zonder verlies van effectiviteit.

### **De toekomst van immunotherapie bij baarmoederhalskanker?**

Ons onderzoek benadrukt dat er meerdere mechanismen zijn die voorkomen dat het immuun systeem erin slaagt een tumor te bestrijden. Wij laten echter ook zien dat er gunstige immuun profielen bestaan die versterkt of nagebootst kunnen worden om het balans weer in het voordeel van tumor destructie te drijven. Het antwoord tot succes ligt waarschijnlijk in het gebruik van meerdere synergistische therapieën en het combineren van oude en nieuwe therapieën, om de effectiviteit te vergroten en immuun suppressieve werking van de tumor tegen te gaan. Preklinische en klinische studies binnen onze onderzoeksgroep richten zich op het optimaliseren van het HPV16 SLP vaccin en het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Om de bijwerkingen van het vaccin te verminderen en de effectiviteit te vergroten, wordt het gebruik van andere adjuvanten bekeken (bv IFN $\alpha$ , Imiquimod, TLR2) en andere methodes van vaccineren (bv tatoeage) ontwikkelt. Een onderzoek in patiënten met eierstokkanker laat zien dat Tocilizumab de productie van Il-6 kan onderdrukken. Gezien het effect van Il-6 op myeloïde cellen, beschreven in hoofdstuk 5, moet dit verder onderzocht worden in patiënten met baarmoederhalskanker. De standaard chemotherapie tegen baarmoederhalskanker is Carboplatin en Taxol. Recente resultaten van onze onderzoeksgroep laten zien dat behandeling met Carboplatin en Taxol de myeloïde populaties in patiënten normaliseert en dat het een synergistische werking heeft op het HPV16-SLP vaccin. Een ander alternatief is het versterken van het aantal tumor specifieke T cellen door middel van adoptieve T cel therapie, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Een fase 1 studie wordt momenteel opgezet. Stimulatie van CD40 in het bijzijn van IFN- $\gamma$  kan een shift van M2 naar M1 cellen te weegbrengen, zoals beschreven in hoofdstuk 5. Een monoclonale antilichaam tegen CD40, gecombineerd met een vaccin of standaard therapieën zoals chirurgie, chemotherapie of radiotherapie, moet verder onderzocht worden in patiënten met baarmoederhalskanker. Een andere mogelijkheid is het blokkeren van inhiberende receptoren bijvoorbeeld PD-1. PD-1 is een immuun inhiberende receptor dat wordt gevonden op de helft van de tumor

infiltrerende CD8+ T cellen in baarmoederhalskanker. Het blokkeren van PD-1, of zijn ligand PD-1L, zou therapeutische consequenties kunnen hebben voor patiënten met baarmoederhalskanker.

Ons onderzoek geeft nieuw inzicht in de rol van het immuun systeem in HPV geïnduceerde ziekten en in verschillende immunotherapeutische opties die verder worden uitgewerkt in lopende studies. De toekomst van de immunotherapie staat voor ons open. We dienen alle nieuwe behandelingen, en combinaties van behandelingen, nauwkeurig te testen op optimale dosering, interactie, timing en haalbaarheid.

