



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Exploring and modulating the tumor immune microenvironment:  
Towards improving patient outcomes of immunotherapy in lung cancer**  
Theelen, W.S.M.E.

**Citation**

Theelen, W. S. M. E. (2020, October 21). *Exploring and modulating the tumor immune microenvironment: Towards improving patient outcomes of immunotherapy in lung cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137007>

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/1887/137007>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137007> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Theelen, W.S.M.E.

**Title:** Exploring and modulating the tumor immune microenvironment: Towards improving patient outcomes of immunotherapy in lung cancer

**Issue date:** 2020-10-21

## SAMENVATTING

De interactie tussen het immuunsysteem van de gastheer en de groei/controle van tumoren is sinds lange tijd een belangrijk focus van onderzoek binnen de oncologie. Het ontrafelen van het immunologisch micromilieu van tumoren heeft tot belangrijke nieuwe inzichten geleid. Een van de meest bestudeerde mechanismen van het ontsnappen van tumorcellen aan het afweersysteem wordt gemedieerd via de inhiberende programmed death-ligand 1 (PD-L1)/programmed death 1 (PD-1) pathway. Binding van de door de tumorcellen tot expressie gebrachte eiwit PD-L1 aan de PD-1-receptor op cytotoxische T-cellen activeert een remmend signaal leidend tot apoptose of inactivering in deze T-cellen. Hierdoor kan de tumor de immuunrespons van de gastheer ontwijken. Ontwikkeling van immuun checkpoint-remmers (ICI's), zoals monoklonale antilichamen tegen PD-1/PD-L1, hebben bij patiënten met gemetastaseerd niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) geleid tot langdurige immuunresponsen tegen de tumor.

Algemene responspercentages (ORR) en andere patiëntgebonden uitkomsten op behandeling met PD-1/PD-L1-gerichte antilichamen zijn geassocieerd met het expressieniveau van het eiwit PD-L1 op tumoren beoordeeld door middel van immunohistochemie (IHC) en wordt daarom veel gebruikt als een voorspellende klinische biomarker voor respons op PD-1/PD-L1 blokkade. Patiënten met PD-L1-negatieve tumoren hebben echter nog steeds een kans van 8% op respons en zelfs bij het hoogste expressieniveau, namelijk  $\geq 50\%$ , is het percentage van falen van de therapie rond de 70%. Deze resultaten laten zien dat de behandelingsoptie immunotherapie als monotherapie en de biomarker PD-L1-expressie beiden verre van optimaal zijn.

In dit proefschrift werd getracht een beter begrip te krijgen van de samenstelling van het immunologisch micromilieu van tumoren en de interactie hiervan met NSCLC. Ook werd gestreefd naar verbetering van de patiëntgebonden uitkomsten bij gemetastaseerd NSCLC door ICI's te combineren met een potentiële immuunmodulator: radiotherapie (RT). In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding gegeven over de epidemiologie, behandelingsmogelijkheden en mogelijke biomarkers voor immunotherapie bij NSCLC. Verder wordt een korte beschrijving gegeven van het abscopal effect van RT (de out-of-field oftewel systemische antitumorrespons na lokale bestraling) en de biologische rationale van het versterken van de immuunrespons door RT te combineren met ICI's.

### DEEL I. Het exploreren van het immunologisch micromilieu van tumoren

Om het exploreren van het immunologisch micromilieu van tumoren in NSCLC mogelijk te maken, hebben we een database met meer dan 600 tumormonsters van patiënten, die geopereerd zijn, met bijbehorende patiënt- en tumorkarakteristieken opgezet. IHC-kleuringen van afzonderlijk PD-L1 op tumorcellen (TC) en tumor-infiltrerende immuuncellen (IC) werd verkregen. Daarnaast werd CD8-infiltratie op basis van IHC-kleuring, mutatiegegevens en genexpressie van voornamelijk van immuungerelateerde genen verzameld.

In **hoofdstuk 2** hebben we getracht de inzichten in de associaties van PD-L1-expressie en specifieke patiënt- of tumorkarakteristieken te verbeteren. Alleen voor PD-L1-expressie op TC werden positieve

associaties gevonden (KRAS-mutaties en roken), maar geen voor PD-L1-expressie op IC. Vervolgens hebben we de overlap en verschillen tussen expressie van PD-L1 op TC en IC onderzocht. Opvallend was het feit dat meer dan de helft van het cohort een PD-L1-positief immuuninfiltraat bevatte, dat ook geassocieerd was met de expressie van andere immuun(gen)markers, maar zonder opregulatie van PD-L1 op TC. In een aanvullende analyse ontdekten we dat in de subgroep van TC0/IC3-monsters een verminderde IFN $\gamma$ -respons in de TC verantwoordelijk zou kunnen zijn voor het gebrek aan opregulatie van PD-L1 in deze tumoren. Deze bevindingen kunnen bijdragen aan het begrip waarom patiënten met een PD-L1 TC-negatief NSCLC mogelijk nog steeds baat kunnen hebben van behandeling met (alleen) ICI's qua respons en overlevingsvoordeel.

In **hoofdstuk 3** hebben we genexpressie van immuungerelateerde genen door middel van NanoString onderzocht in hetzelfde vroegstadium NSCLC-resectiecohort. We ontdekten dat in het adenocarcinoom (AD) het niveau van algehele inflammatie op basis van immuungenexpressie significant hoger was in vergelijking met het plaveiselcelcarcinoom (SCC). Dit leek verband te houden met een hogere infiltratie van immuuncellen in het tumorbed van AD vergeleken met SCC gezien een significant verschil in tumorcelpercentage tussen beide histologieën, dus een hoger tumorcelpercentage in SCC. Dit kan een verschil in interactie suggereren tussen immuuncellen en tumorcellen tussen de verschillende histologieën. Opvallend was dat een cluster van 34 genen, geïdentificeerd door unsupervised clustering, niet correleerde met het algemene level van inflammatie, de mate van PD-L1-expressie of infiltratie van CD8+ T-cellen. De hoogte van expressie van dit 34-genencluster verschilde niet tussen AD en SCC, maar hoge expressie van deze genetische signature toonde een duidelijk OS-voordeel in SCC, maar niet in AD. Deze bevinding werd gevalideerd in twee onafhankelijke NSCLC-cohorten. Vervolgens probeerden we de aard van deze 34-genensignature te alloceren en vonden daarbij de sterkste correlatie met Natural Killer (NK) cel-gerelateerde genexpressie. Celoppervlakgenen die betrokken zijn bij NK-celherkenning en -doding - *ULBP2* en *HLA-C* - waren significant verschillend tussen SCC en AD ten gunste van onze hypothese, namelijk dat SCC gevoeliger is voor NK-celdoding dan AD. Helaas is er geen vastgestelde gouden standaard voor het beoordelen van NK-celinfiltratie en/of activeringsniveau in tumormonsters. Ook zijn deze cellen over het algemeen schaars binnen het immunologisch micromilieu van tumoren. Onze NK-cel-dubbelkleuring middels IHC was niet in staat om de '34-gen high' te onderscheiden van de '34-gen low' monsters. Bijna alle genen binnen onze 34-genensignature konden niet adequaat worden gemeten met RNA-sequencing technieken vanwege de lage expressieniveaus van de genen in de signature. Verder onderzoek naar de biologische rationale van dergelijke lage-expressie signatures kan nieuwe inzichten opleveren in de rol van immuuncellen, zoals NK-cellen, die in kleine hoeveelheden in het tumorinfiltraat aanwezig zijn.

## **DEEL II. Het moduleren van het immunologisch micromilieu van tumoren**

Hoewel de verbeteringen van de patiëntgebonden resultaten door de introductie van PD-1/PD-L1-antilichamen in gemetastaseerd NSCLC indrukwekkend zijn, is er nog steeds dringend behoefte aan verder onderzoek, vooral voor patiënten die niet reageren op blokkade van immune checkpoints. RT zou een krachtige modulator van het immunologische micromilieu van tumoren kunnen zijn en zou de

immuunrespons tegen tumoren kunnen versterken wanneer deze behandeling gecombineerd wordt met immunotherapie.

In **hoofdstuk 4** wordt een overzicht gegeven van de off-target effecten van RT, het zogenaamde abscopal effect. We beschrijven de biologische rationale hoe RT de mechanismen van falen van immunotherapie kan tegengaan. Ook wordt een overzicht gegeven van preklinische en klinische data die de mogelijke augmentatie van het abscopal effect door RT ondersteunen met name in combinatie met remming van immune checkpoints.

Om de mogelijke klinische impact van het abscopal fenomeen te onderzoeken, werd de PEMBRO-RT-studie opgezet. In deze multicenter studie werden patiënten met gemetastaseerd NSCLC die ten minste één eerdere chemotherapiebehandeling hadden ondergaan maar die niet eerder waren behandeld met immunotherapie, gerandomiseerd tussen behandeling met pembrolizumab (controle-arm) versus behandeling met pembrolizumab binnen een week na drie doses van 8 Gy (24 Gy/3) bestraling op een enkele tumorlaesie (experimentele arm). Er werd gestratificeerd op rookstatus: <10 pakjaren versus  $\geq 10$  pakjaren. Het primaire eindpunt was ORR op 12 weken na randomisatie volgens Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). De resultaten van de PEMBRO-RT-studie worden gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. De intent-to-treat (ITT)-populatie bestond uit 76 patiënten. Hoewel de ORR na 12 weken verdubbelde in de experimentele arm ten opzichte van de controlegroep, was dit verschil niet statistisch significant. De PD-L1-negatieve subgroep had een significant PFS- en OS-voordeel in de experimentele arm ten opzichte van de controlegroep, maar er werden geen verschillen gezien in de totale ITT-populatie met betrekking tot deze uitkomsten. Er werd geen toename in behandelgerelateerde toxiciteit waargenomen in de experimentele arm. Dus hoewel een versterkend effect van RT op de respons op PD-1-blokkade bij patiënten met gemetastaseerd NSCLC werd waargenomen, voldeed de studie niet aan het primaire eindpunt van vooraf gespecificeerde criteria voor zinvol klinisch voordeel.

Het MD Anderson Cancer Center (MDACC) analyseerde de resultaten van een vergelijkbare gerandomiseerde studie met alleen pembrolizumab versus pembrolizumab in combinatie met RT (50Gy/4, stereotactic body radiotherapy (SBRT) of 45Gy/15, traditionele RT). In **hoofdstuk 6** presenteren we de resultaten van de gepoolde analyse van deze twee gerandomiseerde studies. Door het mogelijke abscopal effect in een groter cohort van gemetastaseerd NSCLC-patiënten te onderzoeken, vonden we niet alleen een significante verbetering van het abscopal responspercentage (ARR) in de experimentele arm ten opzichte van de controle-arm, maar werd ook een significant PFS- en OS-voordeel waargenomen in de patiënten behandeld met pembrolizumab en RT. Omdat het gekozen RT-regime niet gerandomiseerd was toegepast, maar gebaseerd op de variabiliteit per studie en/of per discretie van de behandelend arts, was een statistische vergelijking tussen RT-regimes niet haalbaar. De 45Gy/15-subgroep vertoonde echter een ARR vergelijkbaar met de controle-arm, waar de andere twee RT-regimes een ARR van meer dan tweemaal zo hoog lieten zien. Exploratie van het absolute aantal lymfocyten (ALC) toonde een meer uitgesproken daling van de ALC in de 45Gy/15-subgroep ten opzichte van beide andere RT-regimes, wat een hypothese geeft van een nadelig effect op de immuunrespons door traditionele fractionering die mogelijk verder onderzoek behoeft.

## **Toekomstperspectieven**

**Hoofdstuk 7** geeft tenslotte een korte samenvatting van de recente ontwikkelingen in de systemische behandeling van gemetastaseerd NSCLC en daarnaast een algemene discussie over de eerder beschreven bevindingen in dit proefschrift. Alternatieve voorspellende biomarkers voor respons op ICI's, die momenteel worden onderzocht lijken veelbelovend, maar hebben tot nu toe niet bewezen toegankelijker en/of betrouwbaarder te zijn dan de biomarker PD-L1-expressie op tumorcellen middels IHC. Verder onderzoek zal nodig zijn om de (eerstelijns) behandelingsselectie bij gemetastaseerde NSCLC-patiënten te verbeteren. In dit hoofdstuk wordt ook een overzicht gegeven van lopende translationele onderzoeken van de bloed- en tumormonsters die tijdens de PEMBRO-RT-studie zijn verzameld. Hopelijk zullen deze verder inzicht opleveren in de associaties tussen tumor- en/of patiëntkarakteristieken en het voordeel van een abscopal effect en ons begeleiden bij verdere klinische implementatie van het abscopal fenomeen. Bovendien zijn er inspanningen gaande om het gebruik van immunotherapie in vroegere stadia van NSCLC toe te passen. Bij lokaal gevorderde stadium III-ziekte, waarbij immunotherapie wordt gecombineerd met gelijktijdige chemoradiatie, kunnen mogelijkheden worden geboden om de combinatie van RT met checkpoint-remming verder te onderzoeken. Ook zal neo-adjuvante behandeling van immunotherapie bij resectabele ziekte het mogelijk maken om loco-regionaal pathologisch onderzoek en systemische immunoreacties te onderzoeken en kan het ondersteunen bij de verdere ontwikkeling van biomarkers. En ook het toepassen van neo-adjuvante RT in deze setting kan nuttige inzichten opleveren om het abscopal effect in een klinische setting beter te identificeren. Deze ontwikkelingen kunnen ons helpen bij het optimaliseren van verder onderzoek naar het mogelijke voordeel van het toevoegen van RT aan systemische behandeling zoals immunotherapie in NSCLC.

