



Universiteit
Leiden
The Netherlands

In vivo mechanism of antibody-based immunotherapy

Sow, H.S.

Citation

Sow, H. S. (2020, October 8). *In vivo mechanism of antibody-based immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137306>

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/1887/137306>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137306> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Sow, H.S.

Title: In vivo mechanism of antibody-based immunotherapy

Issue date: 2020-10-08

8

CHAPTER 8.

Samenvatting in het Nederlands

Samenvatting in het Nederlands

Antistoffen die binden aan eiwitten op het oppervlak van tumoren (tumor antigenen) of aan eiwitten die een belangrijke regelende functie hebben in de afweer ('immune check-points') worden met succes toegepast in de kliniek om kanker te bestrijden. Binding van de antistoffen aan tumorantigenen kan niet alleen direct de groei van de tumor remmen of de tumorcellen doden maar ook indirect een tegen de tumor gerichte afweerreactie activeren zoals uit recent onderzoek is gebleken. Antistoffen bestaan uit een variabel deel dat het antigeen bindt en een constant deel (Fc deel) dat kan binden aan Fc-receptoren (Fc γ R), moleculen op het oppervlak van een aantal verschillende type afweercellen. Binding aan FcR van antistoffen die met hun variabel deel aan een tumorcel zijn gebonden, activeert afweerreacties die de tumorcel kunnen doden. Antistoffen die aan immune check-points binden blokkeren de afweerremmende signalen die normaal nodig zijn om een schadelijke overreactie van de afweer te voorkomen. Dit resulteert in de (re)activatie van natuurlijke tegen de tumor gerichte afweerreacties. Omdat zowel bij preklinische als klinische toepassing de reacties op antistoftherapie sterk variëren was het algemene doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek om verschillende behandelingsstrategieën in een aantal preklinische muismodellen te onderzoeken om daarmee de ontwikkeling van verbeterde antistoftherapie te bevorderen.

Immuun checkpoint PD-L1 remt de spontane, tegen de tumor gerichte, reactie van de T-cellen van het afweersysteem. Daarom verhogen PD-L1 blokkerende antistoffen de tegen de tumor gerichte afweer. Het is echter niet duidelijk of de interactie van anti-PD-L1 antistoffen met FcR positief of negatief bijdraagt aan de anti-PD-L1 antistof therapie. In hoofdstuk 2 zijn vier vormen van anti-PD-L1 antistof gebruikt die uitsluitend van elkaar verschilden in de sterkte van de binding van hun Fc deel aan FcR. Alle antistoffen waren even effectief in het onderdrukken van de uitgroei van een dikke darmtumor, MC38 genaamd, in muizen. De therapeutische werkzaamheid van deze anti-PD-L1 antistoffen was noch verminderd noch verhoogd in muizen waarin alle FcR ontbraken, hetgeen suggereert dat Fc γ R geen rol spelen in anti-PD-L1 therapie in het MC38 tumormodel in muizen. Interessant is dat in een ander dikke-darmkankermodel, CT26, de hoogste therapeutische werkzaamheid werd waargenomen bij muizen die anti-PD-L1 ontvingen met de sterkste binding aan FcR. Hieruit kan worden geconcludeerd dat interactie van anti-PD-L1 met FcR de therapeutische werking niet negatief beïnvloedt, maar mogelijk kan bijdragen aan een verhoging van de therapeutische effectiviteit van de anti-PD-L1 antistof afhankelijk van het tumormodel.

Het is aangetoond dat verhoging van de signaalstof TGF- β geproduceerd door cellen in de micro-omgeving van de tumor het therapeutisch effect van anti-PD-L1 vermindert. In Hoofdstuk 3 laat in het MC38 model zien dat de combinatie van een TGF- β remmer en anti-PD-L1 antistof effectiever is dan TGF- β remmer of anti-PD-L1 antistof monotherapie. Dit ging gepaard met een verhoogde infiltratie van CD8⁺ T-cellen in de tumor in vergelijking met monotherapie. TGF- β was echter even effectief als de combinatietherapie bij het onderdrukken van de uitgroei van de agressieve alvleesklier tumor KPC1. Deze resultaten suggereren dat de synergistische anti-tumoractiviteit van anti-PD-L1 en de TGF- β -remmer afhankelijk is van het gebruikte tumormodel. Dat benadrukt het belang van de evaluatie van de werkzaamheid van de verschillende therapieën in verschillende tumormodellen.

Eerder werd aangetoond dat behandeling met een antistof gericht tegen een tumor antigeen op een uitgegroeid melanoom weinig therapeutisch effect sorteert in muizen. In hoofdstuk 4 laten we zien dat de toediening van de signaalstof IL-2 en een de afweer stimulerend middel, imiquimod, aan muizen met een melanoom, het therapeutische effect van een melanoom-specifieke antistof sterk verbetert wat resulteert in een significant hogere overleving van de melanoom dragende muizen. Door muizen te gebruiken die een enkel type Fc γ R of Fc γ R op een bepaald type afweercel misten en door selectief specifieke typen afweercellen te verwijderen, konden we aantonen dat een bepaalde Fc γ R, Fc γ RI, op een bepaald type afweercel, de macrofaag, essentieel was voor de effectiviteit van de combinatie therapie. In aanwezigheid van imiquimod bleken er meer actieve macrofagen met meer Fc γ R op hun celoppervlak in de micro-omgeving van het melanoom aanwezig te zijn. Bovendien bleek een ander type afweercel, de killer T-cel, onontbeerlijk voor de therapeutische werking van de combinatietherapie. Deze bevindingen tonen aan dat het verhogen van de aanwezigheid in de tumor micro-omgeving van bepaalde afweercellen met veel Fc γ R op hun celoppervlak door een middel zoals imiquimod, dat de afweer stimuleert, kan dienen als een strategie om de effectiviteit van antistoftherapie te verbeteren en tonen tevens het belang aan van het initiëren van T-celreacties.

De belangrijke rol van T-cellen in de werkzaamheid van de tegen tumoren gerichte antistoffen wordt verder toegelicht in hoofdstuk 5. Tumoren wijken af van normaal gezond weefsel en kunnen daarom meestal herkend worden door het afweersysteem dat wil zeggen dat ze immunogeen zijn. De mate van immunogeniciteit varieert echter tussen tumoren. Hoofdstuk 5 laat zien dat sterk immunogene tumoren een groter aantal infiltrerende T-cellen in hun micro-omgeving bevatten dan minder immunogene tumoren. De verhoogde aanwezigheid van T-cellen was geassocieerd met een verhoogde anti-tumoractiviteit van een therapeutische antistof die een tumor antigeen, neu, op borsttumoren herkent. Dit suggereert dat het indelen in groepen van kankerpatiënten met neu⁺ borsttumoren op basis van de reeds in de tumor aanwezige T-cellen nuttig kan zijn bij het voorspellen van de respons bij anti-neu antistof therapie. Eerdere studies suggereren dat Fc γ R zouden kunnen bijdragen aan anti-neu antistof-therapie. Het meest recente onderzoek naar de rol van Fc γ R werd echter uitgevoerd in BALB/c-muizen die deficiënt waren voor de gemeenschappelijke FcR- γ keten. Deze muizen hebben weliswaar geen functionele activerende FcR maar missen daarnaast ook andere relevante receptoren waar de gemeenschappelijke FcR γ keten ook deel van uit maakt. De rol van Fc γ R in anti-neu antistof therapie is daarom niet eenduidig vastgesteld. Bovendien is de bijdrage van elk type Fc γ R en type afweercel dat Fc γ R op zijn celoppervlak heeft aan anti-neu antistof therapie niet *in vivo* vastgesteld omdat de meeste Fc γ R knock-out muizenstammen een C57BL/6 genetische achtergrond hebben, terwijl het MMTV-NeuT borsttumor muismodel een BALB/c achtergrond heeft. Hoofdstuk 6 beschrijft het genereren en karakteriseren van een MMTV-NeuT muismodel op een C57BL/6 achtergrond. Belangrijk is dat er geen verschil was in de infiltratie van afweercellen in de tumoren in BALB/c-NeuT en C57BL/6-NeuT muizen wat suggereert dat C57BL/6-NeuT een goed alternatief tumormodel kan zijn voor preklinische studies. In toekomstige studies kan met behulp van verschillende celtype-specifieke Fc γ R-deficiënte C57BL/6-NeuT muizen de specifieke bijdrage van elke Fc γ R in de therapeutische werkzaamheid van anti-neu mAb-therapie worden vastgesteld. Dergelijke informatie kan

helpen bij het ontwerpen van nieuwe strategieën voor het verhogen van de therapeutische effectiviteit van antilichamen gericht tegen tumoren.

Summary

Antibodies that bind to proteins on the surface of tumors (tumor antigens) or to proteins that have an important regulatory function in the immune system ("immune checkpoints") are successfully used in the clinic to fight cancer. Binding of the antibodies to tumor antigens can not only directly inhibit tumor growth or kill the tumor cells but can also indirectly activate an immune response directed against the tumor, as recent research has shown. Antibodies consist of a variable region that binds to the antigen and a constant region (Fc region) that can bind to Fc receptors (FcγR), molecules on the surface of a number of different types of immune cells. Binding to FcγR of antibodies, bound to a tumor cell with their variable region, activates immune responses that can kill the tumor cell. Antibodies that bind to immune checkpoints block the immune-inhibiting signals that are normally needed to prevent a harmful over-reaction of the immune system. This results in the (re) activation of natural anti-tumor responses. As the response to antibody therapy varies widely in both preclinical and clinical application, the overall goal of the study described in this thesis was to investigate different treatment strategies in a number of pre-clinical mouse models to facilitate the development of improved antibody therapy.

The PD-L1 immune checkpoint inhibits the spontaneous response of the T cells of the immune system against the tumor. Therefore, PD-L1 blocking antibodies increase the immune response against the tumor. However, it is not clear whether the interaction of anti-PD-L1 antibodies with FcR contributes positively or negatively to the anti-PD-L1 antibody therapy. In Chapter 2 four forms of anti-PD-L1 antiserum are used that differed only in the strength of the binding of their Fc part to FcγR. All antibodies were equally effective in suppressing the growth of a colon cancer called MC38 in mice. The therapeutic efficacy of these anti-PD-L1 antibodies was neither reduced nor increased in mice lacking all FcγR, suggesting that FcR did not play a role in anti-PD-L1 therapy in the MC38 tumor model in mice. Interestingly, in another colon cancer model, CT26, the highest therapeutic efficacy was observed in mice receiving anti-PD-L1 with the strongest binding to FcγR. From this it can be concluded that interaction of anti-PD-L1 with FcγR does not negatively influence the therapeutic effect but may increase the therapeutic efficacy of the antibody depending on the tumor model.

Increased production of TGF-β by cells in the microenvironment of the tumor has been shown to reduce the therapeutic efficacy of anti-PD-L1. In Chapter 3 it is demonstrated in the MC38 model that the combination of a TGF-β inhibitor and anti-PD-L1 antibody was more effective than TGF-β or anti-PD-L1 monotherapy. This was accompanied by an increased infiltration of CD8⁺ T cells into the tumor compared to monotherapy. However, TGF-β was as effective as the combination therapy in suppressing the growth of the aggressive pancreatic tumor KPC1. These results suggest that the cooperative anti-tumor activity of anti-PDL1 and the TGF-β inhibitor is dependent on the tumor model. This emphasizes the importance of evaluating the efficacy of different therapies in different tumor models.

It was previously shown that treatment with an antibody directed against a tumor antigen on an established melanoma has little therapeutic effect in mice. In chapter 4 we show that the

administration of the cytokine IL-2 and an immune-stimulating agent, imiquimod, to mice with an established melanoma, greatly improves the therapeutic effect of a melanoma-specific antibody, resulting in a significantly higher survival of the melanoma bearing mice. By using mice that missed a single type of Fc γ R or the Fc γ R on only a particular cell type and by selectively removing specific types of immune cells, we were able to demonstrate that one particular Fc γ R, Fc γ RI, on a particular type of immune cell, the macrophage, was essential for the effectiveness of the combination therapy. In the presence of imiquimod, more active macrophages with more Fc γ R were found to be present on their cell surface in the microenvironment of the melanoma. Moreover, a different type of immune cell, the killer T cell, was indispensable for the therapeutic effect of the combination therapy. These findings show that increasing the presence in the tumor microenvironment of certain immune cells with high FcR on their cell surface by an agent such as imiquimod that stimulates the immune system can serve as a strategy to improve the effectiveness of antibody therapy and also show the importance of initiating T cell responses.

The important role of T cells in the effectiveness of tumor targeting antibodies is further explained in Chapter 5. Tumors deviate from normal healthy tissue and can therefore usually be recognized by the immune system, ie they are immunogenic. However, the degree of immunogenicity varies between tumors. In chapter 5, it is shown that highly immunogenic tumors contain a greater number of infiltrating T cells in their microenvironment than fewer immunogenic tumors. The higher infiltration of T cells was associated with the increased anti-tumor activity of a therapeutic antibody that recognises the tumor antigen rat-neu on mammary tumors. This suggests that classification into groups of cancer patients with Her2⁺ tumors based on the number of T cells already present in the tumor may be useful to predict the response with anti-Her2 antibody therapy. Previous studies suggest that Fc γ R could contribute to anti-neu antibody therapy. However, most recent research on the role of Fc γ R was conducted in BALB/c mice that were deficient for the common FcR- γ chain. Although these mice do not have functional activating Fc γ Rs, they also lack other relevant receptor complexes of which the common FcR- γ chain is also part. The role of Fc γ R in anti-neu antibody therapy has therefore not been clearly established. In addition, the contribution of each type of FcR and type of immune cell that expresses Fc γ R, to anti-neu antibody therapy has not been established *in vivo* because most Fc γ R knockout mouse strains are on C57BL/6 background, whereas the mouse MMTV-NeuT mammary tumor model is on BALB/c background. Chapter 6 describes the generation and characterization of a MMTV-NeuT mouse on C57BL/6 background. Importantly, there was no difference in the infiltration of immune cells into the tumors in BALB/c-NeuT and C57BL/6-NeuT mice, suggesting that C57BL/6-NeuT could be an alternative tumor model for preclinical studies. In future studies, with different cell type-specific FcR-deficient C57BL/6-NeuT mice the specific contribution of each Fc γ R to the therapeutic efficacy of anti-neu mAb therapy can be determined. Such information would help to design new strategies for increasing the therapeutic effectiveness of tumor targeting antibodies.