



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Mechanisms of cancer immunotherapy combinations**

Sluis, T.C. van der

### **Citation**

Sluis, T. C. van der. (2016, September 13). *Mechanisms of cancer immunotherapy combinations*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/43077>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/43077>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

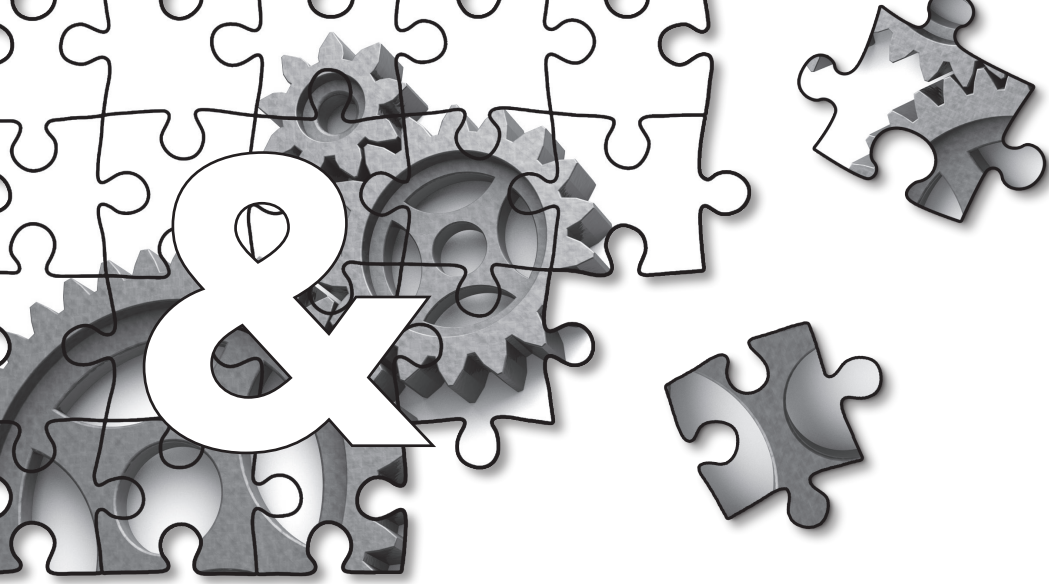


The handle <http://hdl.handle.net/1887/43077> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Sluis, T.C. van der

**Title:** Mechanisms of cancer immunotherapy combinations

**Issue Date:** 2016-09-20



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het afweersysteem is ontwikkeld om ons te beschermen tegen ziekteverwekkers (pathogenen) zoals parasieten, bacteriën en virussen, maar kan ook bescherming bieden tegen afwijkende lichaamseigen cellen, zoals tumorcellen. Het afweersysteem bestaat uit veel verschillende soorten witte bloedcellen, die samenwerken om het lichaam gezond te houden. Het wordt onderverdeeld in het aangeboren (niet-specifieke) en adaptieve (specifieke) deel. Een voorbeeld van een cel van het aangeboren afweersysteem is de macrofaag. Na activatie kunnen macrofagen pathogenen of tumorcellen doden. Tevens scheiden ze signaalstofjes (chemokines en cytokines) uit die andere soorten immuuncellen aantrekken naar de plek van de ontsteking.

Kenmerkend aan cellen van het adaptieve afweersysteem is dat ze kleine maar zeer specifieke delen van pathogenen of tumorcellen (antigenen) specifiek herkennen, resulterend in een reactie van het afweersysteem. Het ontwikkelen van een sterke reactie duurt in het algemeen één tot twee weken, omdat expansie nodig is van lage aantallen cellen met een specifieke T-celreceptor voor het betreffende antigeen en resulteert in de ontwikkeling van “geheugen” voor deze antigenen. Dit geheugen zorgt ervoor dat het afweersysteem snel en adequaat kan reageren wanneer het lichaam opnieuw in aanraking komt met hetzelfde pathogeen of dezelfde tumor. De cellen van het adaptieve afweersysteem zijn de B-cellen, die antistoffen maken, en de T-cellen. De T-cellen kunnen worden onderverdeeld in twee soorten: de helper T-cellen en de cytotoxische T-cellen. Helper T-cellen worden gekenmerkt door de expressie van het “cluster van differentiatie” (CD)4 molecuul aan het celoppervlak en zijn belangrijk bij het reguleren van een immuunreactie. De cytotoxische T-cellen worden gekenmerkt door de expressie van het CD8 molecuul aan het celoppervlak en de productie van stoffen die ertoe leiden dat virusgeïnfecteerde cellen en tumorcellen doodgaan.

Antigen presenterende cellen (APC's), zoals dendritische cellen, zijn cruciaal voor de activatie van T-cellen. Ze kunnen antigenen in hun omgeving opnemen en afbreken. Kleine fragmenten van antigenen (peptiden) binden vervolgens aan zogenoemde “major histocompatibiliteitscomplex” (MHC) moleculen die aan de buitenkant van de APC worden gepresenteerd aan de T-cellen. Om een T-cel goed te kunnen activeren moet de geactiveerde APC drie signalen aan de T-cel afgeven. Het eerste signaal betreft de herkenning van het peptide in het MHC molecuul door de T-celreceptor (TCR). Het tweede betreft de interacties van verschillende moleculen op het celoppervlak van de T-cel en de APC (co-stimulatie) terwijl het derde signaal bestaat uit cytokinen geproduceerd door de APC's. Voor een goede T-celactivatie is het cruciaal dat de drie signalen voldoende aanwezig zijn, iets wat het best wordt bewerkstelligd door gerijpte (geactiveerde) APC's. Rijping van APC's vindt plaats als deze gevaarsignalen ontvangen in de vorm van lichaamsvreemde structuren of bepaalde cellulaire eiwitten via hun verschillende receptoren. T-cellen die geactiveerd zijn door uitgerijpte APC's gaan zich sterk vermenigvuldigen (delen) en ontwikkelen de capaciteit om effectormoleculen te produceren. Deze moleculen zijn belangrijk bij het doden van virus-geïnfecteerde cellen en ook bij het doden van tumorcellen. Een T-celreactie moet krachtig zijn, maar niet te lang duren. Een te sterke of te lang durende reactie zal ongewenste schade aan gezonde weefsels kunnen veroorzaken. Om dit te voorkomen neemt gewoonlijk na de eerste expansie het aantal T-cellen weer af.

T-cellen die tumorantigenen herkennen, worden regelmatig gedetecteerd in het bloed en de tumoren van kankerpatiënten. Voorbeelden van antigenen die worden herkend door

T-cellen zijn gemuteerde antigenen of antigenen die verhoogd tot expressie komen op tumorcellen. Een ander voorbeeld van tumor-antigenen zijn virale antigenen afkomstig van virussen die tumoren veroorzaken. De aanwezige tumor-specifieke T-cellen zijn vaak niet effectief genoeg of in onvoldoende aantallen aanwezig in de tumor om genoeg tumorcellen te kunnen doden.

Naast T-cellen bevatten tumoren een mix van verschillende andere immuuncellen. De balans tussen de immuuncellen die de tumorgroei bevorderen en de cellen die dat niet doen is belangrijk voor de prognose van kankerpatiënten. Myeloïde cellen, zoals macrofagen, komen veel voor in tumoren. Sommige subpopulaties kunnen een rol spelen bij de aanleg van bloedvaten of kunnen de overleving van tumorcellen bevorderen, terwijl andere myeloïde cellen juist in staat zijn om mee te helpen bij het opruimen van tumorcellen.

Kankertherapie heeft zich lange tijd gericht op het direct doden van kankercellen door middel van bijvoorbeeld chemotherapie of bestraling. Deze methoden resulteren vaak in een sterke tumorregressie, maar zijn meestal niet afdoende voor volledige en definitieve tumoropruiming. Bovendien geven ze vaak heftige bijwerkingen, en regelmatig wordt de tumor na verloop van tijd ongevoelig voor dit type behandeling.

Een relatief nieuwe behandeling tegen kanker is immuuntherapie. Deze therapie is bedoeld om het afweersysteem zodanig te activeren dat de tumor volledig wordt opgeruimd. Immuuntherapie kan worden gebruikt om een tumor-specifieke T-celrespons te induceren of te versterken. Een voorbeeld van een methode om dat te doen is de injectie van grote hoeveelheden tumor-specifieke T-cellen. Een andere mogelijkheid is het inspuiten van antistoffen die ervoor zorgen dat er geen remming plaatsvindt van de T-celreactie. Een derde mogelijkheid is therapeutische vaccinatie. Hierbij worden tumorantigenen in het lichaam van een kankerpatiënt gespoten met het doel om een tumor-specifieke T-celreactie te stimuleren.

Een voorbeeld van een vaccin is een synthetisch lange peptiden (SLP) vaccin. De patiënt wordt gevaccineerd met kleine stukjes eiwit (peptiden). Vervolgens kunnen de dendritische cellen deze opnemen en presenteren aan T-cellen, resulterend in een tumor-specifieke T-celrespons. Deze therapie bleek effectief, omdat alleen dendritische cellen in staat zijn om SLP efficiënt op te nemen en te “processen” voor presentatie als epitopen in MHC moleculen. Eerder heeft onze onderzoeksgroep SLP vaccinatie al gebruikt in de behandeling van tumoren geïnduceerd door het humaan papillomavirus (HPV). Deze manier van vaccinatie is erg efficiënt gebleken bij patiënten met voorstadia van HPV-gerelateerde tumoren. Echter, bij patiënten met vergevorderde stadia van HPV-geïnduceerde kankers bleek vaccinatie niet voldoende om een sterke klinische respons te induceren.

Helaas werkt immuuntherapie niet even goed in alle patiënten. Inzicht in de mechanismen die daarbij een rol kunnen spelen kan helpen bij het verbeteren van het verder ontwikkelen van immuuntherapie en inzicht geven in welke combinaties van therapieën goed samenwerken. Tijdens mijn promotie onderzoek heb ik in proefdieren bestudeerd wat het effect van combinaties van verschillende soorten kankertherapieën is op de tumorgroei. Vaststelling van de onderliggende afweersysteem-gerelateerde werkingsmechanismen heeft tot het inzicht geleid dat het niet altijd nodig is om klakkeloos de bijwerkingen van sommige therapieën te accepteren. Het heeft ook geleid tot kennis over welke verschillende therapieën goed samenwerken en ook welke dat niet doen.

In **hoofdstuk 2** is een muismodel voor melanoom gebruikt om de rol van myeloïde cellen in deze tumoren te onderzoeken. Allereerst bleek dat het percentage van een bepaalde soort myeloïde cellen (macrofagen met de “CSF-1 receptor”) sterk toenam in het bloed van tumor-dragende muizen. Om dit te voorkomen zijn de muizen behandeld met “PLX3397”, een medicijn wat de CSF-1 receptor kan blokkeren. Dit leidde tot een normalisatie van de myeloïde cellen in het bloed van de muizen en tot minder macrofagen in de tumor. Daarnaast was de uitgroei van tumoren vertraagd in muizen behandeld met PLX3397, waardoor deze een iets betere overleving vertoonden. Om de behandeling te verbeteren werd PLX3397 gecombineerd met de infusie van tumor-specifieke T-cellen en vaccinatie. Deze combinatie resulteerde in een nog sterkere vertraging van de tumor-uitgroei. Hieruit concludeerden wij dat PLX3397 veilig is te combineren met de infusie van tumor-specifieke T-cellen en vaccinatie. Ook concludeerden we dat combinatie behandeling met deze drie kankertherapieën beter werkt dan therapie met slechts een of twee van de drie.

In **hoofdstuk 3** is de interactie tussen vaccinatie-geïnduceerde T-cellen en myeloïde cellen bestudeerd. Er werd gebruik gemaakt van twee verschillende tumor-modellen die beiden HPV gerelateerde tumorantigenen tot expressie brengen. De muizen werden gevaccineerd met SLP gebaseerd op de HPV antigenen. Opvallend genoeg zagen we dat vaccinatie in het ene tumor-model (TC-1) resulteerde in sterke, doch tijdelijke tumorregressie maar in het andere model (C3) totaal geen effect had. Analyse van de tumoren in deze muizen toonde aan dat TC-1 tumoren sterk geïnfiltrerd werden door vaccinatie-geïnduceerde, functionele, tumor-specifieke T-cellen. Tezamen met deze T-cellen werd ook een influx van vele myeloïde cellen in de tumor geconstateerd. Door het weghalen van verschillende T-celsubpopulaties werd aangetoond dat de CD8 T-cellen, en met name de door deze cellen geproduceerde cytokines Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) en Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF $\alpha$ ), verantwoordelijk waren voor de influx van myeloïde cellen. In het C3 model kwamen de vaccin-geïnduceerde T-cellen niet in de tumor waardoor het aantal myeloïde cellen onveranderd bleef. We dachten dat het effect van vaccinatie versterkt zou kunnen worden door het weghalen van macrofagen met behulp van PLX3397, zoals gedaan in **hoofdstuk 2**. Echter, ondanks de waarneming dat een groot deel van de myeloïde cellen werd verwijderd door PLX3397, resulteerde de combinatie van SLP vaccinatie met PLX3397 in een slechtere overleving van de muizen. Verder onderzoek naar de exacte mechanismen is nog nodig, maar we denken dat de vaccinatie-geïnduceerde T-cellen de functie van de myeloïde cellen hebben gemoduleerd, waardoor ze nu juist in positieve zin gaan bijdragen aan het anti-tumor effect van vaccinatie. Het weghalen van deze cellen met behulp van PLX3397 ondermijnt dan het effect van de therapie. Deze data laten duidelijk zien dat een combinatie van verschillend werkende immunotherapieën niet altijd beter hoeft te zijn dan slechts één van de twee, en sterk afhankelijk is van de mechanismen die een rol spelen in de gebruikte therapieën.

In **hoofdstuk 4** zijn dezelfde twee tumormodellen gebruikt om het effect van cisplatine, een veelgebruikt chemotherapeutikum, te bestuderen. Een toenemende dosis cisplatine voor de behandeling van muizen met tumoren gaf meer bijwerkingen, maar ook een betere overleving. De maximaal tolereerbare dosis cisplatine leidde tot de complete regressie van tumoren in de helft van de muizen. Verdere studies toonden aan dat de langdurige werking van cisplatine afhankelijk was van de in het lichaam aanwezige CD8 T-cellen. Analyse van de tumoren

van de behandelde muizen liet zien dat cisplatine behandeling resulteert in de infiltratie van myeloïde cellen met een hogere expressie van de costimulatiemoleculen CD70, CD80 en CD86. De expressie van deze moleculen was zeer relevant omdat tumor-dragende muizen die deze costimulatiemoleculen missen veel slechter reageerden op behandeling met cisplatine. Toevoeging van SLP vaccinatie resulteerde in een sterk verbeterd anti-tumor effect.

Eerder stelden we vast dat SLP vaccinatie, bedoeld om een T-celreactie te ontwikkelen tegen de HPV-antigenen, niet of nauwelijks in een goede T-celimmuunrespons of klinisch effect resulteert bij patiënten met laat-stadium HPV-gerelateerde tumoren. Patiënten met HPV-geïnduceerde baarmoederhalskanker worden vaak behandeld met een combinatie van de twee chemotherapeutica carboplatine en paclitaxel, gezamenlijk carbotaxol genoemd. In **hoofdstuk 5** is onderzoek gedaan naar de effecten van gecombineerde behandeling van carbotaxol en SLP vaccinatie. In muizen met een TC-1 tumor resulteerde deze combinatietherapie vaak in een sterke regressie van de tumor en in de meerderheid van de dieren ook in een complete genezing. Carbotaxol bleek geen negatief effect te hebben op de ontwikkeling van de vaccin-geïnduceerde T-celrespons. Vergelijkbaar aan de data gepresenteerd in **hoofdstuk 2** bleken ook muizen met een TC-1 tumor een verhoging te hebben van het percentage myeloïde cellen in het bloed. Chemo-immuntherapieresulteerde in een verlaging van de myeloïde cellen in het bloed en in de tumor. Hetzelfde werd gezien in het bloed van patiënten met vergevorderde stadia van baarmoederhalskanker. Ook hier resulteerde een behandeling met carbotaxol in een verlaging van de abnormale hoge aantallen myeloïde cellen in het bloed, waarbij de T-celaantallen niet daalden. Deze verlaging correspondeerde met een verbeterde T-celreactie, een observatie die het duidelijkst was rond 2 weken na de tweede cyclus chemotherapie die de patiënten ontvingen. Met die kennis zijn eindstadium baarmoederhalskanker-patiënten zoals gebruikelijk behandeld met carbotaxol, echter nu hebben de patienten 2 weken na de tweede chemotherapie cyclus ook nog één dosis van het SLP vaccin gekregen. Het bleek dat de vaccin-geïnduceerde T-celreactie veel sterker was dan in eerdere klinische studies. Dit onderzoek heeft laten zien dat carbotaxol de tumor-gerelateerde toename in myeloïde cellen kan normaliseren en dat dit de (tumor specifieke-) T-celrespons ten goede komt. Echter, studies in meer patiënten en met de juiste controlegroepen zijn nodig om te kunnen concluderen of en hoeveel deze combinatietherapie de klinische respons kan verbeteren ten opzichte van chemotherapie of vaccinatie alleen.

In **hoofdstuk 6a** hebben we voor zeven verschillende chemotherapeutica getest of ze goed samenwerken met SLP vaccinatie. Deze studie liet zien dat geen van de zeven klinisch relevante chemotherapeutica een negatief effect heeft op SLP vaccinatie: Drie van deze chemotherapeutica hadden geen invloed op het effect van SLP vaccinatie terwijl de vier andere juist samenwerken met lange peptide vaccinatie. Vooral cisplatine werkte goed met SLP vaccinatie samen. Muizen die SLP vaccinatie samen kregen met twee maal een dosis cisplatine van 40% van de maximum dosis hadden een vergelijkbare overleving als de muizen die SLP vaccinatie kregen in combinatie met een eenmalige, maximale dosis van cisplatine. Analyse van het bloed van de muizen liet zien dat ook cisplatine geen effect heeft op de vaccinatie-geïnduceerde T-celrespons. Vaccinatie alleen, maar niet cisplatine alleen, resulteerde in de infiltratie in de tumor van veel IFN- $\gamma$  en TNF $\alpha$  producerende T-cellen. Opvallend genoeg had cisplatine geen effect op het aantal of de functie van tumor-infiltrerende T-cellen. Een belangrijke observatie was dat de delingscapaciteit

van de tumorcellen in muizen die behandeld waren met cisplatine en SLP vaccinatie, lager was dan die uit onbehandelde, cisplatine of vaccinatie-behandelde muizen. Een tweede observatie was de aanwezigheid van veel meer dode cellen in de tumoren van muizen behandeld met de combinatietherapie. Om dit te kunnen begrijpen werden verschillende soorten tumorcellen in het laboratorium gekweekt, en behandeld met cisplatine en de twee T-celgeproduceerde cytokines TNF $\alpha$  en IFN- $\gamma$ . De combinatie van TNF $\alpha$  en cisplatine resulteerde in een veel hoger percentage dode tumorcellen. De rol van TNF $\alpha$  hierin was zeer belangrijk want neutralisatie *in vivo* van dit cytokine, middels het inspuiten van antistoffen hiertegen, liet een verminderd succes zien in de behandeling van tumor-dragende muizen met cisplatine en SLP vaccinatie. In **hoofdstuk 6b** hebben we deze data verder bediscussieerd.

In de behandeling van kanker wordt cisplatine regelmatig gecombineerd met een ander chemotherapeuticum, topotecan. Deze combinatietherapie resulteert in een betere overleving dan behandeling met alleen cisplatine. In **hoofdstuk 7** werd onderzocht of ook deze chemocombinatie goed samengaat met SLP vaccinatie. In bijna alle muizen met een TC-1 tumor werd de tumor opgeruimd na behandeling met de combinatie van SLP vaccinatie en beide chemotherapeutica. Ook nu was dit effect afhankelijk van de aanwezigheid van CD8 T-cellen. Topotecan bleek echter wel een effect te hebben op de CD8 T-celreactie. De deling en contractie van de vaccinatie-specifieke CD8 T-celrespons was duidelijk veranderd. Terwijl SLP vaccinatie normaal resulteerde in een snelle deling van tumor-specifieke T-cellen bleek dit niet op te treden wanneer muizen topotecan kregen. De proliferatie van de CD8 T-cellen kwam pas op gang nadat de topotecan behandeling was gestopt. Dit resulteerde alsnog in aantallen CD8 T-cellen die niet onderdeden voor de aantallen die enkele dagen daarvoor werden gevonden in muizen die geen topotecan hadden gekregen. Daarnaast duurde het ook langer voordat de aantallen CD8 T-cellen weer afnamen. Gezamenlijk hebben deze data laten zien dat hoewel topotecan de CD8 T-celexpansie vertraagt, dit wel kan resulteren in een sterke anti-tumorrespons. Klinisch zijn deze resultaten van groot belang: bij combinatietherapie van immuuntherapieën chemotherapie wordt de huidige kennis over de kinetiek van de T-celrespons gebruikt om te bepalen wanneer welke van deze therapieën wordt gegeven. De kennis over hoe chemotherapie de kinetiek van de immuuntherapie-geïnduceerde T-celrespons kan veranderen is cruciaal in de vaststelling van het behandelingsschema.

In **hoofdstuk 8** hebben we gekeken naar bijwerkingen van een andere immuuntherapie die wordt gebruikt tegen kanker: antistof gericht tegen CTLA-4. Het CTLA-4 molecuul komt tot expressie op geactiveerde T-cellen en functioneert als een rem van de T-cellen. Systemische toediening (via het bloed) van deze antistof kan helpen om de tumor specifieke T-celreactie in patiënten te verbeteren, en in de afgelopen jaren zijn er al veel patiënten succesvol behandeld met deze therapie. Echter, het blokkeren van CTLA-4 is ook geassocieerd met autoimmunoreacties die overal in het lichaam kunnen optreden. Om dat te voorkomen werd in dit hoofdstuk de antistof in een lagere dosis tussen de tumor en de lymfeknoop ingespoten. De antistof werd toegediend in een olie-water emulsie, die ervoor zorgt dat de antistof langzaam vrij komt. Het bleek dat er op die manier een achtmaal lagere dosis dan de systemische dosis kon worden gebruikt om tumoren op te ruimen. Een groot voordeel van deze lokale toediening was dat het gepaard ging met een veel lagere dosis van de antistof in het bloed, corresponderend met een



gereduceerd risico op autoimmuun-reacties. Belangrijk daarbij was dat de lokale behandeling niet alleen resulteerde in het opruimen van de tumor waarbij het middel was gespoten, maar ook in de opruiming van tumoren verderop in het lichaam van de muis, omdat de lokale behandeling een systemische respons van T-cellen induceerde, die gemakkelijk in het bloed kon worden vastgesteld. Recentelijk zijn de eerste patiënten behandeld met lokaal toegediende CTLA-4 blokkerende antilichamen en de eerste resultaten lijken hoopgevend.

In **hoofdstuk 9** heb ik de belangrijkste wetenschappelijke artikelen van de afgelopen jaren die betrekking hebben op vaccinatie tegen HPV geïnduceerde tumoren bediscussieerd. Uit al deze data is duidelijk gebleken dat een T-celreactie met een goed therapeutisch effect alleen tot zijn recht kan komen als de aanwezige immuunsuppressie wordt verminderd. De beste combinaties van therapieën kunnen alleen gekozen worden wanneer er zoveel mogelijk kennis is vergaard over de werking van de individuele componenten.

In **hoofdstuk 10** heb ik andere aspecten van dit proefschrift bediscussieerd. Zo blijkt uit de data gepresenteerd in de eerste hoofdstukken van mijn proefschrift dat myeloïde cellen in verschillende tumoren en na verschillende behandelingen kunnen veranderen en ook een ander effect op de uitkomst van de behandeling kunnen hebben. Daarnaast heb ik aan de discussie nog een **appendix** toegevoegd. Net als in **hoofdstuk 8** hebben we gewerkt aan checkpoint blokkade moleculen. In dit hoofdstuk worden kort de door ons gevonden data met anti PD-1 en anti PD-L1 beschreven. Blokkade van deze moleculen kan de T-celreactie tegen tumoren verbeteren, een behandeling die effectief is gebleken in patiënten. SLP vaccinatie leidt tot de expressie van PD-1 op intratumorale T-cellen en tot expressie van PD-L1 op de myeloïde cellen en de tumorcellen. Echter antistoffen tegen PD-1 of PD-L1 versterkten de tumor specifieke T-celrespons na vaccinatie niet. Daarnaast was de overleving van de muizen die antistoffen kregen in combinatie met vaccinatie niet of nauwelijks beter dan de overleving van muizen die alleen vaccinatie kregen. Deze data laten wederom zien dat niet alle bestaande kankertherapieën elkaar per se versterken.

Gezamenlijk hebben de data die gepresenteerd worden in dit proefschrift laten zien dat het belangrijk is om inzicht te hebben in de interacties tussen verschillende celtypes en behandelwijzen. Gezamenlijk zal dit leiden tot een verlaging van de toxiciteit van de behandeling en een verbetering van de klinische respons in kankerpatiënten.

