



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Harnessing the immunostimulatory properties of oncolytic reovirus for anticancer immunotherapy

Groeneveldt, P.C.

Citation

Groeneveldt, P. C. (2023, November 23). *Harnessing the immunostimulatory properties of oncolytic reovirus for anticancer immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3663612>

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/1887/3663612>

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

APPENDICES

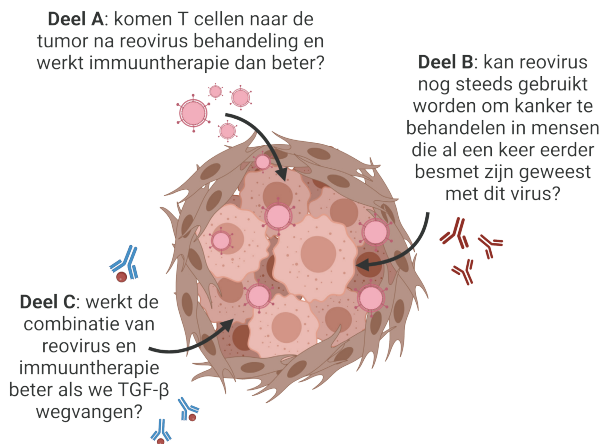
NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

Het immuunsysteem beschermt ons lichaam tegen indringers zoals virussen en bacteriën. Het bestaat uit veel verschillende soorten witte bloedcellen, die samenwerken om deze indringers te bestrijden en ons lichaam gezond te houden. Twee belangrijke spelers van het immuunsysteem zijn B cellen en T cellen. B cellen kunnen voorkomen dat een indringer een gezonde cel van het lichaam infecteert, door neutraliserende antilichamen te produceren die aan virussen of bacteriën kunnen binden en daarbij de indringer wegvangen. Mocht zo'n infectie toch plaatsgevonden hebben, dan komen de T cellen aan bod. Er bestaan verschillende soorten T cellen, maar met name de cytotoxische CD8⁺ T cellen zijn erg goed in staat om een geïnfecteerde cel te herkennen en te doden. De CD8⁺ T cellen kunnen dit doen doordat een geïnfecteerde cel kleine stukjes van het virus of de bacterie (ook wel antigenen genoemd) presenteert op de oppervlakte. Een T cel is speciaal opgeleid om deze stukjes te herkennen en elke cel die deze antigenen presenteert te doden. Elke T cel herkent maar één antigeen, dit wordt T cel specificiteit genoemd. Nadat de geïnfecteerde cel door de T cel is opgeruimd blijven er altijd een aantal geheugen T cellen bestaan, die voor een snellere reactie kunnen zorgen als er op een later moment opnieuw een infectie plaatsvindt.

Naast virussen en bacteriën zijn tumorcellen ook (deels) lichaamsvreemd. Het idee om het immuunsysteem te gebruiken om kankercellen te doden, ook wel immuuntherapie genoemd, heeft geleid tot ongekende verbeteringen in de behandeling van verschillende soorten kanker. Er bestaan verschillende soorten immuuntherapieën, en veel daarvan zijn gericht op het activeren of toedienen van T cellen die stukjes eiwit herkennen die specifiek gepresenteerd worden op de oppervlakte van tumorcellen (tumor-specifieke antigenen). Deze T cellen worden tumor-specifieke T cellen genoemd. Maar, sommige soorten tumoren, zoals alveesklierkanker, zijn nauwelijks gevoelig voor immuuntherapie. Dit komt onder andere doordat deze tumoren niet of nauwelijks tumor-specifieke antigenen presenteren op de oppervlakte. Het immuunsysteem herkent deze tumoren dus niet als lichaamsvreemd, en daardoor zijn er ook nauwelijks (tumor-specifieke) T cellen in deze tumoren te vinden. Omdat veel soorten immuuntherapie juist deze (tumor-specifieke) T cellen nodig hebben om hun werk te doen, werkt immuuntherapie niet goed in tumoren zoals alveesklierkanker.

In dit proefschrift hebben we onderzocht of oncolytisch reovirus gebruikt kan worden om immuuntherapie beter te laten werken in deze tot op heden ongevoelige tumoren. Oncolytische virussen, zoals reovirus, zijn virussen die zich alleen in tumorcellen kunnen vermenigvuldigen en gezonde cellen met rust laten. Doordat deze virussen tumorcellen infecteren en zich daar vermenigvuldigen, kan dit uiteindelijk leiden tot de dood van de kankercel. Daarnaast, omdat deze virussen dus wel als lichaamsvreemd gezien worden door het immuunsysteem, kunnen deze virussen misschien ook wel gebruikt worden om T cellen naar de tumor toe te trekken en als zodanig de werking van immuuntherapie te verbeteren.

Dit proefschrift bestaat uit verschillende delen (**Figuur 1**). In **Deel A** hebben we eerst onderzocht of behandeling met oncolytisch reovirus er inderdaad voor zorgt dat er meer T cellen naar de tumor komen, en of we daarmee kunnen zorgen dat immunotherapie beter werkt in tumoren die daar normaal niet op reageren. Aangezien oncolytisch reovirus een virus is waarmee veel mensen in hun kindertijd al een keer geïnfecteerd zijn, hebben veel mensen al geheugen opgebouwd tegen reovirus. Dit wordt ook wel ‘reeds bestaande immuniteit’ genoemd. In **Deel B** hebben we daarom onderzocht wat het effect van reeds bestaande immuniteit is op de werking van oncolytisch reovirus therapie is, zowel als het alleen wordt toegediend of als het gecombineerd wordt met immunotherapie (zogenaamde viro-immunotherapie). Als laatste hebben we in **Deel C** onderzocht wat er gebeurt met de werking van viro-immunotherapie als we een molecuul genaamd transformerende groeifactor- β (TGF- β) wegvangen. TGF- β heeft heel veel verschillende functies, onder andere zorgt het ervoor dat T cellen minder goed de tumor kunnen binnenkomen en dat hun functie geremd wordt. We hebben bestudeerd of het wegvangen van TGF- β ervoor zorgt dat de T cellen beter de tumor konden inkomen en actiever zouden zijn, en of dit dan leidt tot een verbeterde werking van viro-immunotherapie.



Figuur 1. Overzicht van de verschillende onderzoeksvragen die centraal staan in elk deel van deze thesis. In **Deel A** onderzoeken we of reovirus behandeling ervoor zorgt dat er meer T cellen de tumor binnenkomen, en of we daardoor deze tumoren effectiever kunnen behandelen met immunotherapie. In **Deel B** kijken we of reovirus nog steeds gebruikt kan worden om kankerpatiënten te behandelen als zij al een keertje in hun leven besmet zijn geweest met reovirus en dus ‘reeds bestaande immuniteit’ hebben opgebouwd. Als laatste onderzoeken we in **Deel C** of we de effectiviteit van reovirus in combinatie met immunotherapie kunnen verbeteren als we de cytokine transformerende groeifactor- β (TGF- β) wegvangen.

Deel A: het benutten van reovirus-specifieke t cellen voor de behandeling van kanker

In **Hoofdstuk 2** zijn we begonnen met het bestuderen van de immunoreactie die plaatsvindt na toediening van reovirus. We gebruiken hiervoor muizen die een functioneel immuunsysteem hebben, en injecteren alvleesklier tumorcellen in de

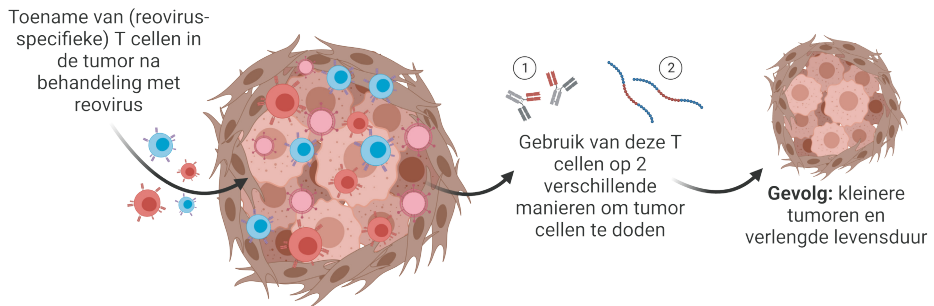
flank. In de flank groeit binnen 2 weken een tumor, waarin wij vervolgens reovirus intratumoraal (direct in de tumor) kunnen toedienen. We hebben gezien dat intratumorale toediening van reovirus leidt tot infectie van de tumorcellen en een snelle expressie van allerlei infectie-gerelateerde genen. De expressie van deze verschillende genen zorgt ervoor dat immuuncellen aangetrokken worden tot de tumor.

Deze toestroom van immuuncellen bestond met name uit CD8⁺ cytotoxische (celdodende) T cellen, wat een goed teken is. We zagen echter ook dat een groot deel van deze CD8⁺ T cellen niet tumor-specifiek was, maar reovirus-specifiek. Dit betekent dat ze alleen tumorcellen konden herkennen en doden die geïnfecteerd waren en daarom een stukje virus op hun oppervlakte presenteren, maar de rest van de tumorcellen die niet door het virus zijn geïnfecteerd worden niet herkend.

Om deze virus-specifieke CD8⁺ T cellen aan te zetten om ook de niet geïnfecteerde kankercellen te doden, hebben we in **Hoofdstuk 2** gebruik gemaakt van CD3-bispecifieke antilichamen. CD3-bispecifieke antilichamen hebben 2 'armen', waarbij de ene 'arm' kan binden aan CD3 (een eiwit dat op de oppervlakte van alle T cellen aanwezig is) en de andere 'arm' kan binden aan een eiwit dat op de tumorcel tot expressie komt. Als beide 'armen' gebonden zijn, wordt de T cel geactiveerd en zal deze de tumorcel doden. Op deze manier kan iedere T cel, dus ook reovirus-specifieke T cellen, aangezet worden om tumorcellen te doden. We hebben inderdaad gezien dat de combinatie van reovirus behandeling (om T cellen naar de tumor te loodsen), gevolgd door CD3-bispecifieke antilichamen (om de T cellen aan te zetten tot het doden van tumorcellen), zeer effectief was en zorgde voor verkleinde tumoren en een langere levensduur van de muizen. We zagen zelfs dat deze combinatie effectief was als we reovirus intraveneus (dus via de bloedbaan) in plaats van direct in de tumor (intratumoraal) toedienden, en dat ook andere tumoren naast de behandelde tumor in de flank kleiner werden. Dus, het gebruik van reovirus in combinatie met CD3-bispecifieke antilichamen leidt tot een zeer effectieve therapie.

In **Hoofdstuk 3** hebben we reovirus-specifieke CD8⁺ T cellen op een andere manier benut. Hier hebben we eerst ontdekt welk kleine stukje van reovirus nu precies herkend wordt door de reovirus-specifieke T cellen. Toen we dit wisten, konden we heel gericht onderzoeken hoe snel reovirus-specifieke T cellen in de tumor komen, hoeveel er komen, en hoe actief ze zijn. We ontdekten dat de reovirus-specifieke CD8⁺ T cellen in de tumor krachtige en actieve cellen zijn, en theoretisch gezien zouden ze dus tumorcellen die geïnfecteerd zijn met reovirus moeten herkennen en doden. We wilden daarom een manier vinden om zo veel mogelijk reovirus-specifieke T cellen in de tumor te krijgen, zodat er veel tumorcellen gedood zouden worden. We hebben dit gedaan door muizen te vaccineren met een synthetisch lang peptide (SLP) vaccin wat het kleine stukje van reovirus bevatte dat normaliter door reovirus-specifieke T cellen herkend wordt. Door deze vaccinatie strategie konden we ervoor zorgen dat deze muizen al heel veel circulerende reovirus-specifieke T cellen hadden, zonder dat ze ooit reovirus zelf

toegediend hadden gekregen. Op het moment dat de gevaccineerde muizen reovirus intratumoraal kregen toegediend, gingen de tumoren in muizen met veel circulerende reovirus-specifieke T cellen langzamer groeien. Wij denken dat dit komt doordat de T-cellen de reovirus-geïnfecteerde tumorcellen konden herkennen en aanvallen. Dus, het onderzoek beschreven in **Hoofdstukken 2 en 3** laat twee verschillende manieren zien waarop reovirus-specifieke T cellen kunnen worden benut voor effectieve anti-kankertherapie (**Figuur 2**).



Figuur 2. Het benutten van reovirus-specifieke T cellen voor de behandeling van kanker.

Het inspuiten van reovirus in de tumor zorgt voor een snelle toestroom van reovirus-specifieke T cellen. Deze reovirus-specifieke T cellen kunnen geactiveerd worden met CD3-bispecifieke antilichamen (1) en op die manier tumorcellen doden. Ook kan vaccinatie met een SLP (2) gebruikt worden om ervoor te zorgen dat er al heel veel reovirus-specifieke T cellen circuleren, die vervolgens allemaal naar de tumor migreren zodra reovirus daar geïnjecteerd wordt en daar geïnfecteerde tumorcellen kunnen doden. In beide gevallen leidt dit tot kleinere en/of langzamer groeiende tumoren, wat de levensduur verlengt.

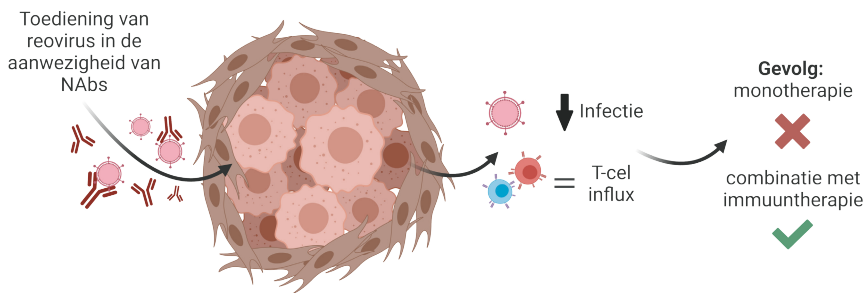
Deel B: het effect van reeds bestaande immuniteit op reovirus therapie

Een groot deel van de menselijke bevolking is tijdens hun leven als eens met reovirus in aanraking gekomen. Hierdoor heeft het immuunsysteem van veel kankerpatiënten al geheugen tegen reovirus heeft opgebouwd, voordat de behandeling met reovirus plaatsgevonden heeft. We vroegen ons daarom af of deze reeds bestaande immuniteit gevolgen zou hebben voor de werkzaamheid van reovirus (combinatie)therapie.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van de huidige literatuur over het effect van reeds bestaande immuniteit tegen verschillende oncolytische virussen, inclusief reovirus, op hun werkzaamheid bij gebruik als therapeutische middelen tegen kanker. In **Hoofdstuk 5** hebben we het gevolg van reeds bestaande immuniteit op de effectiviteit van reovirus therapie onderzocht. We hebben hier vooral gekeken naar het effect van reeds aanwezige neutraliserende antilichamen (NAbs), die door B cellen geproduceerd worden en reovirus snel kunnen wegvangen voordat het de tumorcel kan infecteren. We wilden weten of de aanwezigheid van deze NAbs verhindert dat het reovirus tumorcellen kan doden, maar ook of hierdoor de immuun-stimulerende werking van reovirus (dus het aantrekken van T cellen naar de tumor) beïnvloed wordt.

A

We hebben het bloed van 100 mensen onderzocht voor de aanwezigheid van NAbs, en konden in ruim 80% van de mensen deze NAbs terugvinden. Dit betekent dus dat een groot deel van de mensen al eens besmet is geweest met reovirus. Om te onderzoeken wat het effect van deze NAbs is, hebben we vervolgens een aantal muizen besmet met reovirus (zodat ze veel NAbs ontwikkelen), en een ander aantal controlemuizen onbesmet gelaten. Vervolgens hebben we bij alle muizen tumorcellen ingespoten in de flank, en toen de tumor gegroeid was hebben we reovirus intratumoraal geïnjecteerd. Eerst hebben we onderzocht of reovirus nog tumorcellen kan doden in de aanwezigheid van NAbs. Toen we de mate van reovirus infectie vergeleken tussen tumoren van muizen zonder NAbs en muizen met NAbs, zagen we dat reovirus infectie sterk verminderd is door de aanwezigheid van NAbs. Het tegenover gestelde zagen we in muizen die genetisch aangepast zijn zodat ze geen B cellen hebben, en daardoor dus ook geen NAbs kunnen produceren. In deze muizen zorgde reovirus behandeling ervoor dat tumoren langzamer groeien of zelfs kleiner worden. Dus, de aanwezigheid van NAbs zorgt ervoor dat reovirus niet goed in staat is om tumorcellen te doden en reovirus als monotherapie niet goed werkt (**Figuur 3**).



Figuur 3. Het effect van de reeds bestaande immuniteit op reovirus therapie. De aanwezigheid van neutraliserende antilichamen (NAbs) vermindert de infectie van reovirus in de tumor, en dit zorgt ervoor dat reovirus uiteindelijk minder tumorcellen kan doden. T cellen worden echter nog steeds wel aangetrokken richting de tumor, en deze T cellen kunnen nog steeds benut worden met immunotherapie.

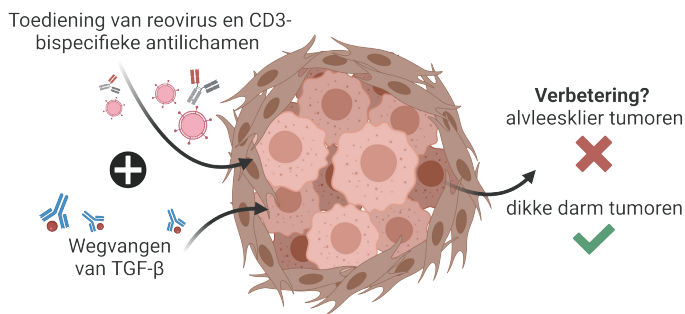
In **Hoofdstukken 2 en 3** hadden we ontdekt dat wanneer tumorcellen geïnfecteerd worden door reovirus, dit ervoor zorgt dat CD8⁺ T cellen naar de tumor komen. Interessant genoeg was de hoeveelheid T cellen in de tumor niet aangetast door de aanwezigheid van NAbs, ondanks dat de infectie van tumorcellen sterk verminderd was. Omdat de hoeveelheid T cellen niet verminderd was in muizen die veel NAbs hadden, werkte immunotherapie met behulp van CD3-bispecifieke antilichamen nog steeds. Dus, hoewel NAbs de werkzaamheid van reovirus als monotherapie belemmerden, was reovirus in combinatie met immunotherapeutische strategieën waarbij de T cellen benut worden nog steeds effectief (**Figuur 3**). In andere woorden, NAbs zorgen ervoor dat we reovirus niet goed op zichzelf kunnen gebruiken om tumorcellen te doden (oncolytische werking), maar het aantrekken van T cellen naar de tumor (immuunstimulerende werking) is nog steeds effectief. Deze resultaten betekenen dat we voor het behandelen van kankerpatiënten eigenlijk altijd reovirus moeten gebruiken in

combinatie met een andere soort immuuntherapie die op het gebruik van T cellen gebaseerd is, omdat we verwachten dat deze combinatie strategieën minder beïnvloed zullen zijn door de aanwezigheid van reeds bestaande NABs in veel kankerpatiënten.

Deel C: het wegvangen van TGF- β om viro-immunotherapie te verbeteren

TGF- β is een molecuul wat heel veel verschillende functies heeft. Het speelt een rol bij het groeien en uitzaaien van tumoren, maar het beïnvloedt ook de functie van verschillende immuuncellen. In **Hoofdstuk 6** hebben we een groot aantal preklinische en klinische studies verzameld die gezamenlijk aangeven dat het wegvangen van TGF- β gecombineerd met het gebruik van oncolytische virussen mogelijk de werkzaamheid van immunotherapie zou kunnen vergroten.

Vervolgens hebben we dit in **Hoofdstuk 7** onderzocht. We hebben hier voor muizen gebruikt met alvleesklier tumoren of dikke darm tumoren, omdat in beide tumor soorten veel TGF- β aanwezig is. We ontdekten dat het wegvangen van TGF- β de werkzaamheid van reovirus en CD3-bispecifieke antilichamen sterk verbeterde in muizen met dikke darm tumoren, maar verrassend genoeg juist verslechterde in muizen met alvleesklier tumoren (**Figuur 4**). Een aantal aspecten verschillen erg tussen deze twee tumor types, zoals de hoeveelheid T cellen die voor behandeling al in de tumor aanwezig is. Een ander verschil tussen deze tumor types is de hoeveelheid stroma (bindweefselcellen en bloedvaten) in de tumor. Met name bindweefselcellen spelen ook een rol in de productie van TGF- β en kunnen de effectiviteit van immuuntherapie beïnvloeden. Helaas zijn we er niet achter gekomen welke factor kan verklaren waarom het wegvangen van TGF- β tot verschillende resultaten leidt. Deze data laten echter wel zien dat het heel belangrijk is om hier meer onderzoek naar te doen, aangezien we de combinatie van reovirus en CD3-bispecifieke antilichamen natuurlijk alleen willen verbeteren en juist niet verslechteren.



Figuur 4. Het wegvangen van TGF- β om viro-immunotherapie te verbeteren. Het wegvangen van transformerende groeifactor- β (TGF- β) zorgt ervoor dat de effectiviteit van reovirus en CD3-bispecifieke antilichamen (dit noemen we ook wel viro-immunotherapie) verslechterd wordt in een model voor alvleesklier kanker, maar juist verbeterd wordt in een model voor dikke darmkanker. Dit verschil kunnen we nog niet verklaren.

A

Conclusie

Gezamenlijk hebben de data die gepresenteerd worden in dit proefschrift laten zien dat het benutten van de immuun-stimulerende eigenschappen van oncolytisch reovirus een zeer doeltreffende manier is om de effectiviteit van immuuntherapie te vergroten. We hopen dat deze verzamelde inzichten gebruikt kunnen worden voor verder fundamenteel onderzoek, maar ook voor de therapeutische toepassing van oncolytisch reovirus, met het uiteindelijke doel om immuuntherapie beter te laten werken en dus kanker beter te kunnen behandelen.