



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Keyhole limpet hemocyanin challenge model for studying adaptive immune system responses in early-phase clinical drug development

Saghari, M.

Citation

Saghari, M. (2024, December 17). *Keyhole limpet hemocyanin challenge model for studying adaptive immune system responses in early-phase clinical drug development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4172487>

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/1887/4172487>

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

CHAPTER IX

**NEDERLANDSE
SAMENVATTING**

INTRODUCTIE

Auto-immuunziekten treffen ongeveer 5–8% van de wereldbevolking. De meeste immunomodulerende geneesmiddelen die momenteel worden gebruikt voor de behandeling van auto-immuunziekten missen specificiteit en gaan gepaard met bijwerkingen vanwege hun brede werking, waaronder het risico op kwaadaardige tumoren en infecties. Daarnaast reageert een aanzienlijk deel van de patiënten niet of niet optimaal op deze behandelingen. Daarom is er een dringende behoefte aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen op basis van een goed moleculair en klinisch begrip van specifieke auto-immuunziekten. Het immuunsysteem, en meer specifiek het adaptieve immuunsysteem, is een belangrijk aandachtsgebied voor de ontwikkeling van dergelijke nieuwe behandelingsstrategieën, vooral voor de behandeling van infecties, tumoren en auto-immuunziekten die resistent zijn tegen conventionele therapieën.

Vanwege het gebrek aan kennis over onderliggende biologische werkingsmechanismen van nieuwe onderzoeksmiddelen komt echter slechts 13,8% van alle geneesmiddelontwikkelingsprogramma's over alle therapeutische gebieden van fase I klinische onderzoeken tot aan marktregistratie. Slechts 6,3% van de anti-inflammatoire en auto-immuun geneesmiddelen wordt uiteindelijk geregistreerd voor klinisch gebruik. Bijna 60% van de ontwikkelingskosten van geneesmiddelen wordt toegeschreven aan falen, waarvan 60% tot 80% te wijten is aan onvoldoende werkzaamheid in latere stadia van de geneesmiddelontwikkeling. Er is daarom een noodzaak voor rationelere strategieën in vroege geneesmiddelontwikkeling. Het kan waardevol zijn om 'proof-of-mechanism' in mensen aan te tonen (bewijs van gewenste farmacologische activiteit) voordat fase II klinische onderzoeken beginnen. Het slagingspercentage in fase II klinische onderzoeken blijkt aanzienlijk hoger wanneer 'proof-of-mechanism' is vastgesteld aan het einde van fase I (29%) in vergelijking met wanneer dit niet is vastgesteld (0%).

Het beoordelen van de farmacologische activiteit van nieuwe immunomodulerende onderzoeksmiddelen tijdens vroege fase klinisch onderzoek kan bemoeilijkt worden door het gebrek aan relevante biomarkers bij gezonde vrijwilligers; het immuunsysteem is immers in rust. Een mogelijke oplossing hiervoor is het gebruik van farmacologische challenge modellen om T-cellen en/of B-cellen van het immuunsysteem van gezonde vrijwilligers te activeren, waardoor de effecten van een onderzoeksmiddel op het adaptieve immuunsysteem kunnen worden geëvalueerd en gekwantificeerd.

KEYHOLE LIMPET HEMOCYANINE

Keyhole limpet hemocyanine (KLH) wordt algemeen beschouwd als een modelantigeen voor gebruik in immunisatiestudies. KLH is een eiwit dat voorkomt in de hemolymfe van de Californische reuzengathoren (*Megathura crenulata*), een weekdier dat voornamelijk voorkomt in de kustwateren van Californië en Mexico. Het is verantwoordelijk voor zuurstoftransport binnen weekdiersoorten. Hemocyaninen zijn vergelijkbaar met hemoglobine dat wordt gevonden in het bloed van gewervelde dieren, maar in plaats van ijzer om zuurstof te binden, bevatten ze koper. KLH is een groot eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 4–8 MDa, samengesteld uit meerdere subeenheden van ongeveer 350–390 kDa elk. Het werd voor het eerst klinisch geïntroduceerd in 1967 om de immunocompetentie van mensen te bestuderen. KLH vertoont uitstekende immunostimulerende eigenschappen in experimenten met dieren en mensen. Zowel de aangeboren als de adaptieve immuunrespons, waaronder de humorale en cellulaire respons, worden geactiveerd door KLH. Het is een waardevol challenge agens voor evaluatie van de adaptieve immuunrespons bij de mens, omdat het menselijke immuunsysteem meestal naïef is voor KLH vóór immunisatie. Dit is niet het geval voor andere antigenen die vaak worden gebruikt in immuun challenge studies bij mensen, zoals varicella zoster of Bacille Calmette-Guérin. Momenteel is subunit KLH geregistreerd als een effectieve immunotherapeutische behandelingsmodaliteit voor blaaskanker. KLH wordt ook gebruikt als haptene-dragereiwit voor kleine moleculen, of als adjuvans in vaccintherapie of samen met immunomodulerende medicijnen.

HUMORALE EN CELGEMEDIEERDE IMMUNITEIT

KLH wekt een sterke systemische primaire humorale respons op na immunisatie bij de mens. Na verwerking van het KLH-antigeen door antigeen-presenterende cellen worden naïeve CD4⁺ T-cellen geactiveerd, die op hun beurt B-cellen activeren, en aanzetten tot proliferatie en differentiatie tot plasmacellen. De respons wordt gekenmerkt door de aanvankelijke productie van anti-KLH-IgM antilichamen, gevolgd door een toename van meer specifieke anti-KLH-IgG antilichamen.

De 'geheugen' functie van het adaptieve immuunsysteem kan worden geëvalueerd door de celgemedieerde immuunrespons te volgen na een initiële KLH-sensitisatie. Wanneer KLH vervolgens intradermaal wordt toegediend, worden de antigenen gepresenteerd door dendritische cellen, waardoor KLH-specifieke CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen in de lymfeklieren worden geactiveerd zodat die gaan prolifereren. Effector T-cellen migreren naar de huid na het primen en imprints van homing-moleculen door

dendritische cellen. De daaropvolgende cutane ontstekingsreactie bestaat uit lokale infiltratie van immuuncellen en verhoogde vasculaire permeabiliteit, wat klinisch kan worden waargenomen als roodheid (erytheem) en zwelling (oedeem).

BEELDVORMING VAN DE HUID

Hoewel de huidreactie subjectief kan worden gemeten door visuele inspectie op erytheem en oedeem, wordt deze methode vaak categorisch beoordeeld, met variabiliteit in de score tussen verschillende beoordelaars. Daarom heeft objectieve kwantificatie van de huidreactie op een continue schaal de voorkeur.

Laser speckle contrast imaging (LSCI) biedt live non-invasieve monitoring van de cutane microvasculaire perfusie. De techniek is gebaseerd op de analyse van speckle-contrast, berekend als de verhouding van de standaardafwijking tot de gemiddelde intensiteit, die een bloedstroomindex oplevert. Oplichting van weefsel met een laser genereert een willekeurig interferentiepatroon (speckle). Dit patroon verandert na verstrooiing van laserlicht door bewegende rode bloedcellen. De intensiteit van elke speckle fluctueert afhankelijk van de snelheid van de bewegende rode bloedcellen, wat resulteert in een afname van het tijd-geïntegreerde speckle-contrast. Vanwege een goede temporele en ruimtelijke resolutie en reproduceerbaarheid is het een nuttig hulpmiddel voor de objectieve kwantificatie van cutane bloedperfusie.

Multispectrale computerondersteunde 3D-beeldvorming van de huid kan worden verkregen met behulp van de Antera 3D[®] camera. Deze innovatieve camera maakt gebruik van multidirectioneel licht in een gesloten ruimte om het huidoppervlak in 3D te reconstrueren. Het brengt de weerkaatsing van licht in kaart van zeven verschillende golflengten licht die het volledige zichtbare spectrum beslaan. Daardoor is het mogelijk een nauwkeurigere analyse te maken van de colorimetrische eigenschappen van de huid (waaronder erytheem). Spectrale beelden worden verkregen en omgezet in een reflectiekaart. De gegevens worden vervolgens omgezet in huidabsorptiecoëfficiënten, en wiskundige correlaties met bekende spectrale absorptiegegevens van hemoglobine worden gebruikt om erytheem te kwantificeren.

SAMENVATTING PROEFSCHRIFT

Het hoofddoel van dit proefschrift was het ontwikkelen en karakteriseren van een humaan challenge model bij gezonde vrijwilligers met behulp van KLH, en het toepassen van het model om de effecten van nieuwe immunomodulerende geneesmiddelen te evalueren.

SECTIE I. ACHTERGRONDINFORMATIE KLH-CHALLENGE MODEL

In dit proefschrift wordt de karakterisering en standaardisatie van het KLH-challenge model beschreven, met de daaropvolgende toepassing van de methodologie voor de evaluatie van de activiteit van nieuwe onderzoeksmiddelen. Hoewel dit model eerder is gebruikt in meerdere klinische onderzoeken, zijn KLH-doseringen, de combinatie met adjuvantia en de toedieningsroutes en regimes voor immunisatie en rechallenge niet gestandaardiseerd. Bovendien zijn de biomarkers voor karakterisatie en kwantificatie van KLH-gedreven immuunreacties niet geoptimaliseerd. Een systematische review uitgevoerd door Swaminathan et al. (2014, DOI: 10.1111/bcp.12422) gaf een overzicht van KLH-doseringen, toedieningsroutes en karakterisatie van de belangrijkste responsen op basis van 16 klinische studies.

Als vervolg biedt [hoofdstuk 2](#) een grondigere systematische review van de KLH-reactie in klinische studies. Dit onderzoek breidt het werk van Swaminathan et al. uit door een groter aantal klinische studies op te nemen, gericht op drie hoofdgebieden: de verschillende methoden die worden gebruikt om de systemische en lokale immuunreacties na KLH-toediening te bestuderen, het identificeren van de meest betrouwbare biomarkers voor analyse van de KLH-respons en het evalueren van de impact van ziekten en farmacologische interventies op de KLH-reactie.

Een overgroot deel van de onderzoeken evalueerde de systemische immuunrespons door anti-KLH-antilichamen te kwantificeren door middel van enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aangezien KLH xenogeen is voor het menselijke immuunsysteem, induceert het een primaire immuunrespons na de initiële KLH-immunisatie, die veelal drie weken na immunisatie een plateau bereikt. Enkele studies analyseerden ook systemische cellulaire en moleculaire reacties. Deze reacties zijn sterk afhankelijk van het aantal KLH-immunisaties en, in mindere mate, van de dosering van de KLH-immunisatie. Lokale 'recall'-immuunresponsen kunnen worden opgewekt door een dermale KLH-challenge, waarbij objectieve kwantificatie met behulp van beeldvormingstechnieken de voorkeur heeft boven subjectieve kwantificatie. Lokale cellulaire en moleculaire reacties na KLH-immunisatie en dermale challenge zijn zelden bestudeerd. De KLH-geïnduceerde immuunrespons kan worden beïnvloed door factoren zoals leeftijd, lichamelijke activiteit, alcoholconsumptie, stress en specifieke auto-immuunziekten. Bovendien is antigeen-tolerantie na orale KLH-inname beschreven. Immunomodulerende geneesmiddelen zoals ciclosporine, fingolimod en monoklonale antilichamen gericht tegen CD28 (VEL-101), CD20 (rituximab), CD28/ICOS (azizolcept), CD80/CD86 (abatacept) en CD134 (KY1005, ook bekend als amlitelimab) onderdrukken effectief de immuunrespons die wordt getriggerd door een KLH-challenge. Concluderend benadrukt onze review het belang van

het implementeren van een KLH-challenge in vroege fase klinisch onderzoek, terwijl het ook de noodzaak onderstreept van gestandaardiseerde en sensitieve methode om KLH-responsen op te wekken en te beoordelen.

SECTIE II. KLH-CHALLENGE MODEL BIJ GEZONDE VRIJWILLIGERS

Een groot gebrek van de meeste studies die gebruik maakten van een KLH-challenge in immunofarmacologische studies is het gebruik van subjectieve kwantificatie om de lokale celgemedieerde reactie te beoordelen na een dermale KLH-challenge. Hoofdstuk 3 beschrijft het gebruik van een KLH-challenge model bij gezonde vrijwilligers met gevoelige en objectieve technieken om de lokale KLH 'recall'-respons te kwantificeren, waardoor de tekortkomingen van subjectieve beoordelingen zoals variabiliteit tussen beoordelaars worden overwonnen. KLH-immunisatie en daaropvolgende intradermale KLH-toediening werden goed verdragen. KLH-immunisatie leidde na drie weken tot verhoogde niveaus van KLH-specifieke antilichamen, wat in overeenstemming was met eerdere literatuur. Een daaropvolgende intradermale KLH-challenge resulteerde in objectief gekwantificeerde verhoogde perfusie van de huid en erytheem, geanalyseerd met behulp van LSCI en multispectrale beeldvorming (Antera 3D[®] camera). In deze studie werd de dermale KLH-challenge respons objectief gemeten met behulp van continue numerieke schalen, waardoor de invloed van variabiliteit tussen beoordelaars, een factor die inherent is aan subjectieve beoordelingsmethoden, werd geminimaliseerd. Door gebruik te maken van non-invasieve beeldvormingstechnieken kan de lokale KLH-respons objectief en kwantitatief geëvalueerd worden, wat van belang is bij het onderzoeken van de farmacodynamiek van immunomodulerende geneesmiddelen in vroege fase klinisch onderzoek.

SECTIE III. KLH-CHALLENGE MODEL IN VROEGE FASE KLINISCH GENEESMIDDELENONDERZOEK

Deze sectie beschrijft de evaluatie van nieuwe immunomodulerende geneesmiddelen in klinische onderzoeken, gebaseerd op het KLH-challenge model zoals uitgevoerd in hoofdstuk 3.

Hoofdstuk 4 beschrijft de eerste toediening aan de mens van een remmer van OX40-ligand (CD134) (KY1005, inmiddels bekend als amlitelimab) en de effecten ervan op het adaptieve immuunsysteem bij gezonde vrijwilligers. Farmacologische activiteit van KY1005 werd waargenomen bij initiële doseringen van 0,45 mg/kg en hoger, gebaseerd op suppressie van KLH-gedreven immuunresponsen. KY1005 toediening resulteerde in een suppressie van de anti-KLH-antilichaamtiter, die meer uitgesproken was voor anti-KLH-IgG dan voor anti-KLH-IgM. KY1005 behandeling leidde tot een dosisafhankelijke remming van de respons op de dermale KLH-challenge, wat de

ontwikkeling en het gebruik van KY1005 in toekomstig onderzoek ondersteunt. Sinds de voltooiing van ons 'first-in-man'-onderzoek met KY1005 is een vervolgonderzoek (fase 2a) in patiënten met atopisch eczeem met succes afgerond. KY1005 werd over het algemeen goed verdragen en vertoonde geen opmerkelijke bijwerkingen. Klinische verbeteringen in Eczema Area and Severity Index (EASI) scores van patiënten met atopisch eczeem werden waargenomen in zowel de lage als hoge dosisgroepen. Deze bevindingen tonen de meerwaarde van gebruik van challenge modellen zoals KLH in de vroege klinische fase van geneesmiddelenontwikkeling. Aangezien OX40-OX40L signalering relatief hoog in de cascade van de adaptieve immuunrespons plaatsvindt en de effecten wijdverspreid zijn, zou KY1005 effectief kunnen zijn voor een breed scala van inflammatoire en immuungemedieerde aandoeningen. Momenteel wordt KY1005 onderzocht in atopisch eczeem (fase 3), hidradenitis suppurativa (fase 2) en astma (fase 2).

Intestinale dysbiose wordt verondersteld modifierende effecten te hebben op zowel het lokale immuunsysteem in de darmen als het systemische immuunsysteem. Het wijzigen van het darmmicrobioom met oraal toegediende probiotica, prebiotica en/of synbiotica lijkt gunstige effecten te hebben op verstoorde systemische immuunresponsen. Hoofdstuk 5 beschrijft de klinische evaluatie van drie formuleringen van een 'single-strain'-microbiële interventie, bereid uit *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (EDP1066). Het doel van het onderzoek was het karakteriseren van de farmacodynamische effecten van EDP1066 op het adaptieve immuunsysteem in gezonde vrijwilligers. Hoofdstuk 6 beschrijft de effecten van een tweede 'single-strain'-microbe, bereid uit *Prevotella histicola* (EDP1815), op het immuunsysteem in gezonde vrijwilligers in een klinische studie. Preklinisch werden er met EDP1066 en EDP1815 veelbelovende resultaten behaald in *in vitro* immuuncelculturen en *in vivo* op basis van immuunchallenges en ziektemodellen in muizen, inclusief het KLH-challenge model. Helaas werden vergelijkbare klinische resultaten niet behaald na dagelijkse EDP1066 toediening, zoals beschreven in hoofdstuk 5. In tegenstelling tot de behandeling met KY1005 werden er geen consistente significante behandelingseffecten op KLH-gedreven responsen in gezonde vrijwilligers waargenomen. Deze bevindingen met EDP1066 kunnen mogelijk worden toegeschreven aan de onmogelijkheid van conventionele allometrische schaling en de daaruit voortvloeiende mogelijkheid van een te lage EDP1066 dosering, hoge individuele responsvariabiliteit door verschillen in dieet en gastro-intestinale microbiële samenstelling en de onzekerheid of EDP1066 voldoende op de doelplaats binnen het gastro-intestinale stelsel terecht kwam. Belangrijk is dat deze bevindingen ook enkele beperkingen van het KLH-challenge model benadrukken, zoals geïmplementeerd in onze onderzoeken, aangezien we ons alleen hadden gefocust op twee eindaspecten van de challenge, namelijk de anti-KLH-antilichaamrespons en de dermale

KLH-challenge respons. Moleculaire en cellulaire analyses tijdens verschillende fasen (presentatie-, activatie-, effector- en geheugenfase) van de adaptieve immunrespons na de KLH-challenge waren geen onderdeel van de gepresenteerde onderzoeken, en hadden mogelijk wel immunomodulerende effecten van de onderzoeksmiddelen kunnen tonen. Mogelijke verklaringen voor de afwezigheid van significante immunomodulerende effecten van EDP1815 in onze klinische proeven, in tegenstelling tot de preklinische experimenten, zijn gelijk aan de eerder gegeven voorbeelden voor EDP1066.

EDP1815 werd echter verder getest in een fase 1b klinisch onderzoek in patiëntenpopulaties met atopisch eczeem en psoriasis, beschreven in [hoofdstuk 7](#). Belangrijk om te vermelden is dat de steekproefgrootte voor het onderzoek in patiënten met atopisch eczeem en psoriasis was gebaseerd op evaluatie van het veiligheidsprofiel van EDP1815, niet om statistische significantie van klinische werkzaamheid aan te tonen. Vergelijkbaar met onze bevindingen bij gezonde vrijwilligers ontbrak een overtuigend behandelingseffect, maar mogelijke tekenen van klinische werkzaamheid van EDP1815 werden waargenomen bij patiënten met atopisch eczeem (gebaseerd op de EASI, Investigator's Global Assessment $\times$ Body Surface Area, Scoring Atopic Dermatitis, Dermatology Life Quality Index, Patient-Oriented Eczema Measure en pruritus Numerical Rating Scale uitkomsten) en psoriasispatiënten (gebaseerd op de Psoriasis Area and Severity Index en Lesion Severity Score uitkomsten) vergeleken met patiënten behandeld met placebo.

DISCUSSIE

We hebben met succes een humaan KLH-challenge model ontwikkeld en gekarakteriseerd bij gezonde vrijwilligers en hebben dit challenge model vervolgens toegepast in verschillende vroege fase klinische studies in gezonde vrijwilligers die (potentieel) immunomodulerende experimentele geneesmiddelen ontvingen. Op basis van de onderzoeken die in dit proefschrift beschreven worden, zijn de onderliggende immunologische routes en de moleculaire en cellulaire betrokkenheid in het model nog niet volledig opgehelderd. Hoewel het KLH-challenge model een waardevolle aanvulling is in klinische proeven in een vroege fase en het primaire doel van dit proefschrift is bereikt, zou verdere optimalisatie en karakterisering van de KLH-gedreven immunrespons waardevol zijn. In onze KLH-onderzoeken waren de primaire eindpunten ELISA-gebaseerde systemische anti-KLH-antilichamen en beeldvorming-gebaseerde dermale KLH-respons. Twee van de vijf kardinale tekenen van ontsteking konden worden waargenomen: warmte (calor) indirect met LSCI en roodheid (rubor) met multispectrale beeldvorming. De warmteperceptie ontstaat door een verhoogde bloedstroom naar koudere omgevingsgebieden door verwijding van de bloedvaten.

Deze respons induceert ook roodheid door de circulatie van erytrocyten in het aangetaste gebied te vergroten. Deze tekenen worden algemeen erkend als aanwezig bij inflammatoire responsen. Een limitatie van onze KLH-onderzoeken is het gebrek aan informatie over betrokken moleculaire en cellulaire routes.

Systemische moleculaire en cellulaire responsen na KLH-immunisatie zijn slechts in enkele onderzoeken beschreven. In deze onderzoeken werden proefpersonen met KLH ten minste twee keer geïmmuniseerd of werd een veel hogere KLH-immunisatiedosis gebruikt dan in onze onderzoeken. Lokale moleculaire en cellulaire responsen na een dermale KLH-challenge kunnen worden geanalyseerd op huidbiopsen of in opgewekte blaren. Hostmann et al. (2015, DOI: 10.1002/eji.201445024) en Kapp et al. (2010, DOI: 10.1002/eji.201040701) toonden aan dat CD4⁺ T-helpercellen en geactiveerde CD4⁺CD154⁺ T-cellen voornamelijk interleukine-2 (IL-2), tumor-necrosefactor en interferon- γ (IFN- γ) produceerden, wat wijst op een systemische T-helpercel type-1 (Th1) respons. In mindere mate werd ook IL-4 secretie door dezelfde celtypen waargenomen, wat wijst op een minder uitgesproken systemische Th2 respons. Spazierer et al. (2009, DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03177.x) toonde een gematigde systemische Th2-verschoven respons aan. Bovendien bereikte de dermale respons een piek ongeveer 24 uur na de challenge, wat wijst op een Th2-gedreven 'late-phase'-huidreactie, terwijl een Th1-gedreven 'delayed-type hypersensitivity' (DTH)-respons doorgaans het sterkst is tussen 48 en 72 uur na de dermale challenge.

Toekomstige klinische proeven met het KLH-challenge model zouden huidig beschikbare, goed beschreven immunomodulerende geneesmiddelen met verschillende werkingsmechanismen moeten omvatten die verschillende onderdelen van het immuunsysteem moduleren. Dit zal onze kennis van het model verbeteren en meer inzicht bieden in hoe deze geneesmiddelen de KLH-respons beïnvloeden. Ciclosporine is zo'n medicijn dat T-celactivatie en -proliferatie remt door calcineurine te remmen en de moleculaire JNK- en p38-routes te blokkeren die betrokken zijn bij antigeenherkenning. Toediening van ciclosporine aan patiënten met auto-immuun uveïtis onderdrukt de KLH-challenge respons, maar de behandeling heeft geen invloed op de humorale en lymfocytenproliferatierespons. Daarentegen vermindert ciclosporine de antilichaamrespons tegen KLH bij ratten na een enkele KLH-toediening.

Rituximab is een zeer specifieke B-celremmer die apoptose drijft door te binden aan het B-cel-specifieke oppervlakte-eiwit CD20. Bingham et al. (2010, DOI: 10.1002/art.25034) onderzocht het effect van KLH-immunisatie bij patiënten met reumatoïde artritis die ofwel methotrexaat of een combinatie van methotrexaat en rituximab ontvingen. De anti-KLH-IgG antilichaamtiter waren drie keer lager bij patiënten die zowel methotrexaat als rituximab ontvingen in vergelijking met patiënten die alleen methotrexaat kregen, wat wijst op een versterkt suppressief effect van rituximab op

B-cellen. Voor zover ons bekend is, is er nog geen KLH-immunisatieonderzoek uitgevoerd bij gezonde vrijwilligers die rituximab kregen toegediend.

Een andere potentiële kandidaat voor het benchmarken van het KLH-challenge model is fingolimod, een modulator van de sphingosine-1-fosfaatreceptor (S1PR). Fingolimod remde dosisafhankelijk de antilichaamrespons tegen KLH in gezonde vrijwilligers. Helaas werden geen significante DTH-responsen waargenomen na een intradermale KLH-challenge, wat door de auteurs werd toegeschreven aan een lage dermale KLH-dosis van 10 µg. Een positieve DTH-respons werd gedefinieerd als een induratie diameter van ≥ 5 mm. Wij hebben met ons onderzoek aangetoond dat het categoriseren van de intradermale KLH-respons in induratiecategorieën onnauwkeurig en ongevoelig is en dat gevoeligere methodologieën, zoals LSCI en multispectrale beeldvorming, kleine dermale KLH-responsen kunnen detecteren, zelfs bij een lagere KLH-dosis van 1 µg.

Ten slotte kan het benchmarken van het KLH-challenge model met niet-specifieke immunosuppressiva, zoals corticosteroïden, ook informatief zijn. Verschillende preklinische proeven hebben immunosuppressieve effecten van dit soort geneesmiddelen op de dermale KLH-respons aangetoond. We konden in de literatuur echter geen klinische proeven vinden die het effect van prednisolon of dexamethason op KLH-responsen bij gezonde vrijwilligers hadden beschreven.

Het KLH-challenge model kan ook worden toegepast in studies met immunostimulantia op de adaptieve immuunrespons, zoals immune checkpoint inhibitors die CTLA-4 (ipilimumab en tremelimumab), PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab en dostarlimab) en PD-L1 (atezolizumab, avelumab en durvalumab) raken. Deze relatief nieuwe immunotherapeutische geneesmiddelen worden steeds belangrijker in de immunotherapie bij kanker en hebben zelfs geleid tot de Nobelprijs voor immunologen James P. Allison en Tasuku Honjo. Preklinisch wordt de KLH-geïnduceerde IFN- γ -productie significant verhoogd na *ex vivo* KLH-herstimulatie bij muizen die met anti-CTLA-4 waren behandeld in vergelijking met de controlegroep. Voor zover ons bekend zijn er tot nu toe geen klinische proeven uitgevoerd die een *in vivo* KLH-challenge model combineren met anti-CTLA-4 therapie. Wat betreft immune checkpoint inhibitors die PD-1 en PD-L1 targeten is er, voor zover ons bekend, helemaal geen KLH-gebaseerd onderzoek uitgevoerd.

CONCLUSIE

De onderzoeken in dit proefschrift tonen aan dat het *in vivo* humane KLH-challenge model een waardevol methodologisch hulpmiddel kan zijn in vroege fase geneesmiddelontwikkeling. Dankzij de uitgebreid beschreven en toegepaste methodologie en

klinische ervaring met KLH en de relatief gemakkelijke implementatie in klinische onderzoeken kan het KLH-challenge model helpen bij het begrijpen en kwantificeren van de farmacologie van nieuwe geneesmiddelen. Het model kan mogelijk bijdragen aan efficiëntere geneesmiddelontwikkelingsprogramma's doordat het mogelijk wordt om in een vroege fase 'proof-of-mechanism' vast te stellen en daarmee farmacologisch actieve doses te selecteren. Deze thesis biedt een raamwerk voor KLH-gebaseerde farmacodynamische evaluatie in een vroege klinische fase voor geneesmiddelen die ontwikkeld zijn om de adaptieve immuunrespons te moduleren. Verdere optimalisatie en karakterisering van het KLH-challenge model en benchmarking van het model met geregistreerde immunomodulerende geneesmiddelen zijn logische vervolgstappen.