

SAMENVATTING

In dit proefschrift worden de effecten op het immuunsysteem van intratumorale (i.t.) toediening van recombinant humaan interleukin-12 (rhIL-12) aan patiënten met een plaveiselcel carcinoom van het hoofdhal gebied (HHPCC) beschreven.

De inleiding en de opzet van het proefschrift in **hoofdstuk 1** geeft een korte samenvatting van de incidentie, de stadiëring en de behandeling van patiënten met een HHPCC. Daarnaast worden de biologische eigenschappen en klinische resultaten van systemisch toegediend interleukine-12 (IL-12) kort beschreven. De opzet van de verrichtte studies wordt gegeven. Het doel van de studies was om na i.t. rhIL-12 toediening aan patiënten met een HHPCC (i) de toxiciteit vast te stellen van de intratumorale toediening, (ii) de farmacokinetiek te bepalen (iii) de farmacodynamische effecten in de primaire tumor, de loco-regionale lymfklieren en het perifere bloed te bestuderen en (iv) eventueel klinische activiteit vast te stellen.

Een overzicht van de in de literatuur gepubliceerde klinische studies bij patiënten met kanker, die behandeld zijn met loco-regionale immunotherapie, is gegeven in **hoofdstuk 2**. Alleen fase I en II studies waren verricht. Klinische responsen werden gezien. Geen enkele locoregionale therapie is een “standaard” behandeling geworden. Relatief weinig onderzoek is verricht naar de effecten op de lokale immuniteit of de immuunsuppressie. We concludeerden dat het belangrijk zou zijn om in toekomstige studies waarin patiënten met loco-regionale immunotherapie behandeld worden, onderzoek te verrichten naar de veranderingen in de primaire tumor en locoregionale lymfklieren na behandeling. Alleen dan is het mogelijk om meer inzicht in de effecten van de gegeven therapie op het immuunsysteem te krijgen.

Hoofdstuk 3 beschrijft een fase I studie, waarin patiënten met een vergevorderde vorm van kanker wekelijks met recombinant humaan IL-12 (rhIL-12), één maal per week subcutaan (s.c.) toegediend, behandeld werden. Veertig patiënten met een melanoom, 14 patiënten met niercelkanker en zes patiënten met een andere vorm van kanker werden ingesloten in de studie; zij werden wekelijks behandeld met rhIL-12 s.c. met doseringen variërend van 30 tot 2100 ng/kg. De maximaal tolereerbare dosis werd niet bereikt, zelfs niet met de hoogst gebruikte dosis rhIL-12. De meest frequente bijwerkingen waren koorts, moeheid, hoofdpijn, misselijkheid en braken. Twee patiënten hadden een “minor” response, maar geen partiële of complete responsen werden gezien. De conclusie van deze fase I studie met s.c. toediening van rhIL-12 was dat het veilig was en relatief goed verdragen werd.

Gebaseerd op de resultaten van deze fase I studie met wekelijkse toediening van rhIL-12 s.c., werden de doseringen voor de intratumorale (i.t.) toediening in HHPCC gekozen. Biologische activiteit was aanwezig op de gekozen doseringen, te weten 100 en 300 ng/kg. In **hoofdstuk 4** beschrijven we de resultaten van een fase Ib studie met i.t. toediening van rhIL-12 in patiënten met een recidief HHPCC na eerdere chirurgie en/of radiotherapie. Zes patiënten werden wekelijks behandeld op twee verschillende doseringen van 100 of 300 ng/kg.

Ze werden maximaal 24 weken behandeld. De toxiciteit was mild. Slechts één patiënt had een graad 4 toxiciteit, namelijk een langdurende lymfopenie. Geen “dose limiting toxicities” traden op. IL-12 was in alle zes patiënten in plasma detecteerbaar 30 minuten na inspuiting. Significante dalingen, maximaal na 12 tot 24 uur, in het absolute aantal perifere bloed lymfocyten en alle lymfocyten subsets, in het bijzonder cytotoxische T cellen en “natural killer” (NK) cellen, werden gezien. De hoogste plasma concentraties van interferon- γ (IFN- γ) en interleukine-10 (IL-10) werden waargenomen na 12 uur.

Een “real-time quantitative polymerase chain reaction” (PCR) analyse in de perifere bloed mononucleaire cellen liet een mediane stijging van het IFN- γ mRNA van 2.2 keer ten opzichte van de uitgangssituatie zien. Een onverwachte, significante daling van 80% van T-bet mRNA, een T helper 1 transcriptiefactor, werd gezien na 12 uur, met een normalisering na 48 tot 72 uur. Complete of partiële responsen werden niet gezien. Eén patiënt had een afname van zijn tumor van 40%.

In vier van de vijf evalueerbare patiënten behandeld in de fase Ib studie veranderde de kleur van de geïnjecteerde tumor tijdens de behandeling. Aanvankelijk werd een rode verkleuring van de tumor waargenomen. Na drie tot vijf weken werd de tumor bleker, wat kon duiden op een effect op de bloedvaten. Vanwege deze waarneming werd de muizenstudie, gepresenteerd in **hoofdstuk 5**, verricht. Het doel was om effecten van i.t. toegediend recombinant muis IL-12 op de micro-omgeving van een humane plaveiselcelcarcinoom van het hoofd-halsgebied xenograft tumor te bestuderen. Het was een onderhuidse tumor met een relatief grote diameter, in BALB/c *nu/nu* muizen. Gedurende 3 dagen werd 200 ng IL-12 of PBA in deze tumoren gespoten. De muizen werden op vier verschillende tijdstippen, tussen 8 uur en 8 dagen na de laatste injectie, opgeofferd. Ondanks een snellere en hogere expressie van anti-muis ICAM-1, als uiting van een activatie van het endotheel, in de IL-12 behandelde muizen, werden geen significante verschillen in dichtheid van vaten, doorbloeding, hypoxie of proliferatie van tumor cellen tussen IL-12 behandelde tumoren en controle tumoren waargenomen. De belangrijkste redenen dat we de observatie bij de mens niet konden aantonen in dit muizen model is waarschijnlijk de combinatie van een gecompromitteerd immuunsysteem in de Balb/c *nu/nu* muizen en de relatief grote tumor die meer “mature” vaten bevat.

Een fase II studie werd verricht om de farmacodynamische effecten en effecten op het immuunsysteem van i.t. toegediend rhIL-12 in de regionale lymfklieren, primaire tumor en het perifere bloed te bestuderen. Tien voorheen onbehandelde patiënten met HHPCC werden wekelijks geïnjecteerd met rhIL-12 in de primaire tumor, voordat ze geopereerd werden. RhIL-12 werd twee tot drie maal toegediend, op twee verschillende doseringen, te weten 100 en 300 ng/kg. We vergeleken deze patiënten met 20 controle HHPCC patiënten, die geen IL-12 toegediend kregen. In **hoofdstuk 6** wordt beschreven dat in deze voorheen onbehandelde HHPCC patiënten de i.t. toediening van rhIL-12, op de gebruikte doseringen van 100 en 300 ng/kg, veel meer bijwerkingen had dan in de voorbehandelde HHPCC patiënten, die behandeld werden in de fase Ib studie. De dosering van 300 ng/kg liet “dose limiting toxicity” zien, ten gevolge van één graad 3 moeheid, één graad 3 leverfunctiestoornissen en één graad 3 metabole acidose na de operatie. De belangrijkste loco-regionale biologische effecten waren (i) een redistributie van lymfocyten van het perifere bloed naar de vergrote lymfklieren in de hals, (ii) een significant hoger percentage NK cellen en een lager percentage T helper (Th) cellen in de lymfklieren en de primaire tumor, en (iii) een grote toename van IFN- γ mRNA in de lymfklieren. Een switch van een Th2 profiel, aanwezig bij controle patiënten, naar een Th1 profiel in de lymfklieren vergeleken met het bloed na IL-12 behandeling, trad op. Opvallend was dat de IL-12 behandelde patiënten, zonder toename

in de T-bet/c-Maf (een T helper 2 transcriptiefactor) ratio in de lymfklieren de slechtste prognose hadden.

Hoofdstuk 7 beschrijft de histologische en immunohistopathologische effecten op de cellen van het immuunsysteem in de primaire tumor en regionale lymfklieren bij patiënten behandeld in de fase II studie. Het grootste effect werd gezien op de NK cellen, met een hoger aantal in de primaire tumor en een hoge IFN- γ mRNA expressie in de lymfklieren. In de IL-12 behandelde patiënten werd een verandering in de architectuur van de lymfklieren gezien door een veranderde distributie van B cellen, minder kiemcentra en minder DC-LAMP+ cellen (uitgerijpte dendritische cellen (DCs)). De peritumorale B cel infiltratie was in sommige behandelde patiënten zeer hoog. Veranderingen in aantal of distributie van CD8+ of CD4+ T lymfocyten werd niet gezien. Wél produceerden de CD8+ en CD4+ T cellen in de IL-12 behandelde patiënten meer IFN- γ . Verder werden veranderingen gezien in cellen van het aangeboren immuunsysteem bij de IL-12 behandelde patiënten. Het aantal neutrofielen in de lymfklieren nam toe. In de primaire tumor, echter, was het aantal neutrofielen in de tumornesten iets lager, terwijl het aantal peritumoraal en intrastromaal gelijk bleven. In IL-12 behandelde patiënten was de meerderheid van de CD68+ cellen (macrofagen) peritumoraal gelokaliseerd in tegenstelling tot in de controle patiënten, waarbij de CD68+ cellen meer gelijkmatig verdeeld waren. In de lymfklieren werd een kleiner aantal mestcellen geteld, terwijl er in de primaire tumor een tendens tot een lager aantal eosinofielen werd gezien na IL-12 behandeling.

In **hoofdstuk 8** hebben we de effecten van i.t. toegediend rhIL-12 op de functie van de B cel en de veranderde architectuur van de lymfklieren in meer detail bestudeerd. Na IL-12 behandeling werden bredere buitenste regio's van mantelzones gezien, terwijl er minder secundaire follikels waren in de vergrote lymfklieren. De afmeting van het kiemcentrum was afgenomen, deels ten gevolge van een afname van het aantal CD57+ GC cellen. De veranderingen werden niet veroorzaakt door veranderingen in apoptose of CXCR5 expressie op de B cel. In drie van de vier geanalyseerde IL-12 behandelde patiënten werd IFN- γ mRNA aangetoond in de B cel, wat niet gevonden werd in 4 onderzochte controle patiënten. In het perifere bloed werd na 8 weken een IgG subklasse switch gezien met een toename van IgG1, een afname van IgG2 en een toename van IgG4. Dit is een uiting van een switch naar meer Th1 profiel. Peritumorale B cel infiltratie had een gunstig effect op de overleving in de 29 onderzochte HHPCC patiënten, onafhankelijk van IL-12 behandeling. Meer IL-12 behandelde dan controle patiënten hadden een hoog aantal peritumorale B cellen, maar dit was niet significant verschillend. IL-12 behandeling induceerde een afname van het aantal DC-LAMP+ cellen en de CD57+ GC cellen. We bediscussieren de rol van deze cellen in het induceren van tolerantie bij de controle HHPCC patiënt en het mogelijk doorbreken van deze tolerantie na IL-12 behandeling.

In **hoofdstuk 9** wordt een algemene beschouwing gegeven en worden plannen voor toekomstig onderzoek besproken.