

University of Groningen

## Multifaceted approaches to tumor microenvironment modulation and immune checkpoint targeting

Melo Gallegos, Vinicio Alejandro

DOI:

[10.33612/diss.1215629783](https://doi.org/10.33612/diss.1215629783)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2025

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Melo Gallegos, V. A. (2025). *Multifaceted approaches to tumor microenvironment modulation and immune checkpoint targeting*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.1215629783>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

---

# CHAPTER 7

---

Nederlandse samenvatting |  
Dutch summary

---

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

De Tumor Micro-omgeving (TME) bestaat uit verschillende celtypen, extracellulaire matrix en signaalmoleculen die zowel de ontwikkeling en metastase van kanker kunnen bevorderen als belemmeren en is een cruciale factor voor het succes van immuuntherapieën. Afweercellen die geïnfiltrerd zijn in de TME kunnen bijvoorbeeld afweerreacties versterken of onderdrukken en zodoende de klinische en biologische aard van kankers vormen [1-3]. Het ontwerpen van specifieke therapeutische strategieën die de TME herprogrammeren en anti-tumor afweerreacties (her)activeren, is daarom van groot belang. Belangrijke remmende factoren in de TME zijn zogeheten controlepunten van het afweersysteem, zoals PD-1/PD-L1 en CD300a. Daarnaast kunnen receptoren die afweercellen activeren, zoals CD27, in de TME te weinig gestimuleerd worden. Deze signaleringsroutes worden dus vaak door tumoren uitgebuit om surveillance door het afweersysteem te ontwijken, waarbij meerdere signaleringsroutes en typen afweercellen gezamenlijk bijdragen aan een omgeving die antikanker afweerresponses remt. Inzicht in dergelijke mogelijke samenwerkende signaleringsroutes kan unieke manieren onthullen om antikanker afweerreacties die worden onderdrukt, therapeutisch te (her)activeren.

In **hoofdstuk 2** onderzochten we een nieuwe remmer van controlepunten in het afweersysteem, een bispecifiek fusie-eiwit (genaamd DSP502) dat gericht is op het blokkeren van twee controlepunten in het afweersysteem, namelijk PVR en PD-L1. DSP502 bestaat uit het extracellulaire domein van de receptoren van beide controlepunten, TIGIT en PD-1, en vormt een stabiele heterodimeer door een constant antilichaam domein (Fc genaamd). DSP502 bindt specifiek aan PVR en PD-L1, waarbij het sterker aan oppervlakken die met beide antigenen waren gecoat bond dan aan oppervlakken die met een van beide antigenen was gecoat. Dit effect, ook wel de 'EN-poort' genoemd, en zorgt ervoor dat DSP502 het meest effectief is als beide antigenen aanwezig zijn. *In vitro* bond DSP502 inderdaad dosisafhankelijk aan kankercellen die PVR en PD-L1 tot expressie brachten, met een aanzienlijke vermindering van binding na blokkering van één van de antigenen. Daarnaast kon DSP502 gelijktijdig CD56+ NK-cellen via het Fc domein aan Fc-receptoren op NK cellen binden. Hierdoor ontstonden doubletten van NK- en tumorcellen, een essentiële eerste stap om NK-gemedieerde tumorceldoding mogelijk te maken. Met behulp van een transcriptoom analyse werd ontdekt dat tumor-reactieve CD8+ T-cellen in een bepaald type longkanker, NSCLC, zowel hoge niveaus van TIGIT als PD-1 tot expressie brengen. DSP502 zou dus een potentiële kandidaat voor heractivering van het afweersysteem in NSCLC kunnen zijn. In experimenten waarin gezonde donor-PBMC's of NSCLC TIL's met kankercellen gemengd werden werd het cytotoxische potentieel van T- en NK-cellen versterkt door DSP502. Opmerkelijk is dat DSP502 ook voorkwam dat een co-stimulerende receptor, DNAM-1, verdween van afweercellen, een effect dat zou kunnen bijdragen aan het therapeutische effect. In *in vivo* studies remde DSP502-behandeling sterk de groei

van tumoren in twee muismodellen. Samenvattend blokkeert het nieuwe therapeutische eiwit DSP502 twee controlepunten van het afweersysteem en kan tegelijkertijd via het Fc domein Fc receptor gemedieerde afweerresponses aanzetten. Deze meervoudige werkwijze van DSP502 positioneert het als een veelbelovende kandidaat voor kankerimmunotherapie, vooral in kankers zoals NSCLC, waar een dubbele PVR- en PD-L1-blokkade bijzonder voordelig kan zijn.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we een strategie om gerichte costimulatie te bieden aan T-cellen via de receptor CD27, een receptor die op de meerderheid van tumorgeïnfiltreerde T-cellen in epitheliale kankers aanwezig is, zoals ook uit een transcriptoom analyse naar voren kwam. Specifiek ontwierpen we een bispecifiek antilichaam dat enerzijds bindt aan het carcinoom-geassocieerde antigeen EGFR en anderzijds aan CD27. Van belang hierbij is dat CD27 signalering afhankelijk is clustering van de receptor op de membraan van afweercellen. CD27xEGFR kan als eiwit maar 1 keer binden en dus geen clustering veroorzaken. Dat kan het alleen na binding aan EGFR op de membraan van een kanker cel, waarna vele CD27xEGFR eiwitten CD27 tegelijk kunnen binden en clusteren. Inderdaad, met behulp van een *in vitro* model van T-celactivatie activeerde CD27xEGFR T-cellen alleen in de aanwezigheid van EGFR+ maar niet EGFR-tumorcellen. Een ander belangrijk aspect in het ontwerp van CD27xEGFR is dat het een zogenaamd 'stil' Fc-domein bevat dat niet bindt aan Fc-receptoren op aangeboren afweercellen. Hiermee zou de activiteit tegen gezond weefsel moeten verminderen omdat dergelijke aangeboren cellen niet geactiveerd worden. Samenvattend, activeerde CD27xEGFR selectief T-cellen en versterkte het anti-tumoractiviteit tegen EGFR-positieve kankercellen, waardoor CD27xEGFR een potentiële therapeutische benadering om in EGFR-positieve kankers TIL cellen te heractiveren.

In **hoofdstuk 4** hebben we de focus verlegd naar aangeboren afweerreacties bij B-cellymfoom, specifiek naar het eiwit CD300a. In onze studie werd CD300a geïdentificeerd als een potentieel relevant doelwit in een grote transcriptoom screening van openbaar beschikbare microarray-expressie data van Diffuus Groot B-Cellymfoom (DLBCL) patiënten. Hier associeerde CD300a met een slechte prognose bij patiënten met niet-kiemcentrum B-cel (non-GCB) DLBCL met hoge expressie van CD47. Uit verdere analyses van deze data bleek dat niet DLBCL-cellen, maar macrofagen en neutrofielen de cellen waren met de hoogste expressie van CD300a. Dit suggereerde dat de associatie van CD300a met de overleving van patiënten specifiek zou kunnen samenhangen met het reguleren van het aangeboren afweersysteem. Bevestiging hiervoor werd gevonden *in vitro*, waarbij genexpressieanalyse en membraankleuring op primaire tumormateriaal van patiënten een hoge expressie in macrofagen en neutrofielen liet zien ten opzichte van DLBCL-cellen. Vanuit literatuur is bekend dat CD300a binding aan lipide liganden PS en PE remt de activiteit van fagocyten. Deze interactie zou dus in DLBCL ervoor kunnen zorgen dat maligne cellen ontsnappen aan opruiming. Inderdaad bleek in het lab dat blokkeren van de interactie tussen CD300a



en zijn liganden met een anti-CD300a antilichaam zorgde voor meer opruiming van DBLCL cellen door macrofagen en neutrofielen, specifiek bij het non-GCB subtype van DLBCL. Dit effect kwam door blokkering van het controlepunt CD300a en niet door activatie van aangeboren afweercellen via Fc-receptoren, dit omdat behandeling met een fragment van het CD300a antilichaam (F(ab')<sub>2</sub> genaamd) dat geen Fc-domein bevat, ook resulteerde in een toename in antikanker activiteit van neutrofielen. In een verdere retrospectieve analyse van patiënt-expressiedata bleek CD300a-expressie ook van belang bij patiënten met mantel cel lymfoom (MCL) en oogmelanoom (UM), een vinding die werd bevestigd in *in vitro* werk in het lab. Ons onderzoek toont dus aan dat CD300a een potentieel doelwit kan zijn voor immunotherapie tegen specifieke tumoren en subtypes, met name voor non-GCB DLBCL, MCL en UM.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, **hoofdstuk 5**, werd een literatuuronderzoek uitgevoerd om de huidige kennis over TME-normalisatiestrategieën en de rol van controlepunten in het afweersysteem bij het moduleren van de TME samen te vatten. Specifiek richtte ik me op het begrijpen van de complexe mechanismen waarmee dergelijke controlepunten het gedrag van afweercellen en de vasculatuur binnen de TME veranderen. Een cruciale bevinding uit de onderzochte literatuur is dat blokkering van controlepunten niet alleen de immunorespons versterkt, maar ook bijdraagt aan TME-normalisatie, zoals te zien is in de kliniek waar hun gebruik de effectiviteit van verschillende kankertherapieën heeft vergroot. Deze afweer-bloedvat interactie, gemedieerd door blokkering van controlepunten, wijst op een dubbele modaliteit waarbij bv. de concentratieafhankelijke effecten van IFN $\gamma$  variëren van anti-angiogeen tot vasculaire normalisatie. Bovendien lijken verschillende T-celsubtypes hierbij specifieke effecten te hebben, met CD8<sup>+</sup> T-cellen die pro-angiogeen lijken terwijl CD4<sup>+</sup> T-cellen mogelijk indirect vasculaire normalisatie bevorderen.

De inzichten verzameld in **hoofdstuk 5** onderstrepen het potentieel van TME-normalisatie als een strategie om de uitkomsten van immunotherapie te verbeteren. Bovendien dient dit hoofdstuk als een reflectief verslag van mijn perspectief op het belang van het integreren van TME-normalisatieprincipes in de ontwikkeling van toekomstige therapieën gericht op controlepunten. Door de mechanistische inzichten m.b.t. TME te combineren met klinische observaties, beoogde dit hoofdstuk de weg te banen voor nieuwe therapeutische benaderingen die de ingewikkelde verbindingen tussen het immuunsysteem en tumor vasculatuur uitbuiten .

## REFERENTIES

1. Scott, E.N., et al., *Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 702726.
2. Kohli, K., V.G. Pillarisetty, and T.S. Kim, *Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors*. *Cancer Gene Ther*, 2022. **29**(1): p. 10-21.
3. Galli, F., et al., *Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020. **39**(1): p. 89.







Western Wall and Dome of the Rock in Jerusalem