

# VU Research Portal

## Natural Killer cells from Umbilical Cord blood stem cells

Veluchamy, J.P.

2018

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Veluchamy, J. P. (2018). *Natural Killer cells from Umbilical Cord blood stem cells: A novel immunotherapy platform for solid tumors*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## **Nederlandse samenvatting**

NK cellen of “Natural Killer” cellen bieden een aangeboren bescherming tegen ziekteverwekkende indringers zoals virussen maar ook tegen kankercellen. In patiënten met kanker functioneren NK cellen vaak slecht door afweer onderdrukkende stoffen die door tumoren worden uitgescheiden. Eén manier om deze sabotage van de antikanker afweer te omzeilen is het intraveneus toedienen van grote aantallen NK cellen bij patiënten met kanker (adoptieve toediening). Een haalbare manier om aan voldoende grote aantallen NK cellen te komen voor de behandeling bestaat uit de expansie en differentiatie van NK cellen uit bloedvormende stamcellen uit navelstrengbloed (UCB-NK). In een eerste klinische trial in patiënten met acute myeloïde leukemie is toediening van uit navelstrengbloed afkomstige NK cellen veilig gebleken met eerste aanwijzingen van antikanker effectiviteit. In de studies beschreven in dit proefschrift werd onderzocht hoe adoptieve toediening van uit navelstreng verkregen NK cellen ook effectief ingezet zou kunnen worden bij patiënten met solide tumoren.

De rol van NK cellen in de bestrijding van kanker is intensief bestudeerd zoals samengevat in Hoofdstuk 1. Klinische studies hebben aangetoond dat adoptieve toediening van NK cellen buiten de transplantatie setting voor hematologische maligniteiten veilig is. Bovendien is er aangetoond dat infusie van NK cellen een Graft versus Tumor (GvT) effect initieert zonder de ernstige gevolgen van een omgekeerde afstotingsziekte (van transplantaat tegen de tumor, de zogenaamde Graft versus Host disease, GvHD).

Het is algemeen bekend dat NK cel functies strak gereguleerd zijn door een evenwicht tussen activerende en remmende NK cel receptoren. Verschillende soorten kanker kunnen verminderde expressie van activerende NK cel receptoren veroorzaken, wat leidt tot een verminderd vermogen van de NK cellen om tumorcellen te doden. Daarom is het van groot belang om een beter begrip te krijgen van de expressie niveaus van relevante NK cel receptoren en de functionaliteit van NK cellen in tumoren. Dit heeft ons ertoe gebracht om twee acht-marker NK cel panels voor flowcytometrie (FACS) te ontwerpen en operationeel te krijgen (beschreven in hoofdstuk 2): één om het NK cel fenotype te bestuderen en een andere om de NK cel functionaliteit te bepalen, zowel in bloed als in gedissocieerde tumor monsters. De NK cel FACS panels werden geoptimaliseerd en getest in drie verschillende centra, gebruikmakend van drie verschillende flowcytometers met vergelijkbare configuratie, Zo werd er een uniek platform gecreëerd voor het genereren van vergelijkbare en reproduceerbare gegevens afkomstig uit multicentrische klinische studies. Bovendien benadrukt deze studie ook dat levend ingevroren cel suspensies geschikt zijn om het NK cel fenotype en functionaliteit te bestuderen, zoals bijvoorbeeld NK cel gemedieerde antilichaam afhankelijke cellulaire toxiciteit (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC).

In hoofdstuk 3 is allogene NK cel therapie bestudeerd als combinatie behandeling met anti-EGFR antistoffen (b.v cetuximab) voor tumoren van de baarmoederhals. De cytotoxische effecten van UCB-NK cellen en geactiveerde, uit perifeer bloed verkregen, PBNK cellen werden *in vitro* vergeleken als monotherapie of in combinatie met cetuximab. De NK cel therapie werd getest op tien baarmoederhalskanker cellijnen met verschillende histologische kenmerken en verschillende HPV-types. Deze cellijnen brachten in verschillende mate EGFR tot expressie (van geen tot hoge expressie) en hadden geen RAS mutatie. Niettemin waren

alle resistent voor cetuximab als monotherapie. *In vitro* experimenten toonden aan dat alle baarmoederhalskanker cellijnen gevoelig waren voor NK-gemedieerde celdood, onafhankelijk van de histologie en het HPV type van de tumor. Een interessante uitkomst was dat de UCB-NK gemedieerde celdood van baarmoederhalskanker cellijnen aanzienlijk hoger was dan de celdood veroorzaakt door PBNK cellen en vergelijkbaar was met de mate van celdood ten gevolge van PBNK + cetuximab. De superieure cytotoxiciteit veroorzaakt door UCB-NK cellen was geassocieerd met lage expressie niveaus van NK-remmende receptoren, de zogenaamde Killing Inhibitory Receptors (KIRs), wat ook overeen kwam met de bevinding dat er geen remming door HLA-ABC op de baarmoederhals tumorcellijnen plaats vond. Deze resultaten wijzen op de mogelijkheid om UCB-NK cellen toe te passen in de behandeling van baarmoederhalskanker.

In hoofdstuk 4 hebben we een grote barrière in de behandeling van dikke darmkanker aan de kaak gesteld, namelijk resistentie tegen anti-EGFR/cetuximab therapie. Doordat bijna de helft van de patiënten met uitgezaaide darmkanker RAS mutaties heeft in de EGFR signalering, komen zij niet in aanmerking voor een anti-EGFR behandeling. Echter, door anti-EGFR te combineren met allogene en geactiveerde PBNK cellen, konden we een effectieve celdood van dikke darm kanker cellen induceren, ongeacht het niveau van EGFR expressie en de aan- of afwezigheid van RAS mutaties. Het percentage van dode EGFR<sup>+</sup> tumorcellen na blootstelling aan PBNK cellen was aanzienlijk hoger wanneer dikke darm kankercellen tevens met cetuximab waren behandeld, leidend tot effectieve ADCC. Nog een belangrijke bevinding was dat PBNK cellen ook zeer cytotoxisch waren voor EGFR<sup>-</sup> dikke darm kankercellen, die niet op cetuximab therapie reageerden. Deze resultaten wijzen op de mogelijke potentie van

PBNK cellen, al dan niet gecombineerd met cetuximab, in de behandeling van cetuximab-resistente dikke darmkanker.

In hoofdstuk 5 hebben we de frequentie en de functionaliteit van NK cellen in patiënten met uitgezaaide darmkanker (“metastatic colorectal cancer, mCRC”) voor en na de eerste behandeling van chemotherapie bepaald. We vonden dat patiënten met mCRC niet alleen een verlaagde NK cel frequentie hadden in het perifere bloed vóór de start van chemotherapie, maar dat de frequentie verder was afgenomen na chemotherapie. Naast deze kwantitatieve vermindering in NK cellen van de patiënten was de cytotoxische capaciteit ook verslechterd. Hoewel de cytolytische activiteit van de NK cellen middels ADCC kon worden verhoogd na toevoeging van cetuximab, was het niveau van cytotoxiciteit nog steeds sterk verminderd in vergelijking met de cytotoxische capaciteit van NK cellen van gezonde volwassenen. Deze resultaten lijken aan te geven dat adoptieve toediening van volledig functionele NK cellen wellicht noodzakelijk zal zijn voor het herstel van de NK effector populatie bij patiënten met mCRC. Om dit te testen werden de cytotoxische effecten van twee allogene NK cel producten, namelijk geactiveerde PBNK en UCB-NK cellen vergeleken *in vitro* tegen een panel van dikke darm kanker cellijnen. UCB-NK cellen bleken in deze studie een superieure cytotoxiciteit te vertonen. In overeenstemming met onze bevindingen voor baarmoederhalskanker (Hoofdstuk 3) bleek de cytotoxische capaciteit van UCB-NK cellen vergelijkbaar met de capaciteit van PBNK-cellen in combinatie met cetuximab. Deze superieure cytotoxische effecten van UCB-NK cellen werden bevestigd door een *in vivo* studie, waarin de behandeling met UCB-NK cellen resulteerde in een aanzienlijk verlaagd tumor volume in immuun deficiënte muizen die eerder geïnjecteerd waren met humane EGFR<sup>+</sup>RAS<sup>mut</sup> dikke darm kankercellen. Het is opvallend dat dit effect niet verhoogd werd door

de toevoeging van cetuximab *in vivo*. Dit zou te wijten kunnen zijn aan een suboptimale inductie van de Fc receptor CD16 (een antilichaam bindende receptor) op de adoptief toegediende UCB-NK cellen. Omdat een studie met AML patiënten inmiddels heeft aangetoond dat CD16 expressie levels hoger worden op de UCB-NK cellen na infusie, kan er een synergie verwacht worden door toevoeging van cetuximab in een klinische setting.

In de studies die zijn beschreven in dit proefschrift hebben we aangetoond dat allogene UCB-NK-cellen een superieur anti-tumor effect hebben tegen in dikke darm en baarmoederhalskanker in vergelijking met geactiveerde allogene PBNK cellen. Bovendien bleek de cytotoxische capaciteit van UCB-NK cellen equivalent aan die van PBNK cellen wanneer die werden gecombineerd met cetuximab. Gebaseerd op onze bevindingen concluderen we dat UCB-NK cellen een veelbelovend therapeutisch platform bieden voor de behandeling van solide tumoren, onafhankelijk van hun EGFR of RAS status. De unieke expansie en differentiatie techniek ontwikkeld door Glycostem maakt het mogelijk om grote aantallen allogene en cytotoxisch actieve UCB-NK cellen te genereren. Zo worden een aantal beperkingen van de huidige adoptieve NK cel strategieën omzeild en wordt het mogelijk tegen de immuun suppressieve druk van tumoren in de *in vivo* NK cel effector pool aan te vullen en de aangeboren (natuurlijke) afweer tegen tumoren in patiënten met kanker te versterken. Zoals tenslotte beschreven in hoofdstuk 6, zal in de nabije toekomst de functionaliteit van UCB-NK cellen verder verbeterd worden door gebruik te maken van genetische modificatie of combinatie therapieën, leidend tot een nog effectievere anti-tumor afweer respons.