

Tytuł: Wpływ inhibitora arginazy oraz peptydu RGD na mikrośrodowisko nowotworu i odpowiedź na immunoterapię z użyciem przeciwciała anty-PD-1 w mysim modelu glejaka

Autor: Paulina Pilanc-Kudlek

STRESZCZENIE

Glejak złośliwy z prawidłowym genem IDH1/2 (glioblastoma, GBM, IDH1/2 wt) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym nowotworem mózgu u dorosłych, w przypadku którego obecne terapie nie są skuteczne, a większość guzów nawraca w ciągu kilku miesięcy. Rozwój nowotworu wiąże się z osłabieniem obrony przeciwnowotworowej gospodarza. Celem immunoterapii jest przywrócenie tej odpowiedzi, a inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, np. przeciwciała przeciw cząsteczce PD-1 (anty-PD-1), oferują możliwość całkowitego wyeliminowania nowotworu. Jednak pacjenci z GBM słabo reagują na immunoterapię, ponieważ guzy charakteryzują się słabym naciekiem funkcjonalnych limfocytów T i komórek NK. Gromadzące się w GBM komórki mieloidalne (rezydentny mikroglej i makrofagi obwodowe, glioma associated myeloid cells - GAMs) ulegają przeprogramowaniu i wspomagają nowotwór oraz działają immunosupresyjnie w mikrośrodowisku guza. Jednym z czynników odpowiedzialnych za te procesy jest wydzielane przez glejaka białko SPP1 (secreted phosphoprotein1). Celem mojej pracy było opracowanie nowych strategii reaktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi w złośliwym glejaku i uwrażliwienie guza na działanie przeciwciał anty-PD-1. Strategie te zakładają przeprogramowanie fenotypu komórek GAM. Wykorzystując syngeniczny model glejaka u myszy, zastosowałam dwa podejścia terapeutyczne: i) blokowanie aktywności arginazy 1 (Arg1) za pomocą OAT-1746 — nowego, selektywnego i małocząsteczkowego inhibitora enzymu, oraz ii) zablokowanie działania Spp1 za pomocą krótkiego peptydu blokującego oddziaływanie SPP1-integryny. Aktywacja Arg1 w GAMs prowadzi do wyczerpania L-argininy, niezbędnej przy intensywnej proliferacji komórek T i NK, podczas gdy aktywacja receptorów integrynowych przez Spp1 uczestniczy w indukcji pronowotworowego fenotypu GAMs. Wpływ immunomodulatorów na wzrost glejaka GL261 *in vivo* oceniano za pomocą rezonansu magnetycznego lub platformy do obrazowania przyżyciowego Xtreme. Scharakteryzowano mikrośrodowisko glejaka po podaniu immunomodulatorów

wykorzystując wieloparametryczną analizę cytometrii przepływowej oraz profilowanie transkryptomiczne (RNAseq) izolowanych komórek CD11b⁺. Oceniono skuteczność przeciwnowotworową immunomodulatorów podanych samodzielnie oraz w połączeniu z blokadą PD-1. Doustne podawanie OAT-1746 nie miało wpływu na skład komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka, jednak indukowało zmiany transkryptomiczne w komórkach CD11b⁺ z mózgów myszy otrzymujących ten inhibitor. Podawanie OAT-1746 z przeciwciałem anti-PD-1 doprowadziło do spowolnienia wzrostu nowotworu. Podawany doguzowo peptyd RGD skutecznie blokował przeprogramowanie GAMs w kierunku fenotypu wspierającego glejaka, ale nie wpływał na wielkość guza. Zastosowanie peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anti-PD-1 zmieniało skład i funkcjonalność komórek układu odpornościowego, wzmacniało odpowiedzi prozapalne, co doprowadziło do zmniejszenia wielkości guza. Wyniki badań wskazują, że testowane immunomodulatory zmieniają mikrośrodowisko glejaka, umożliwiają napływ efektorowych limfocytów i wspomagają działanie immunoterapii z inhibitorem immunologicznych punktów kontrolnych.

Title: Effects of arginase inhibitor and RGD peptide on tumor microenvironment and response to immunotherapy using anti-PD-1 antibody in a mouse model of glioma

Author: Paulina Pilanc-Kudlek

ABSTRACT

Malignant glioma with a wild-type IDH1/2 (glioblastoma, GBM, wt-IDH1/2) is the most common and aggressive brain tumor in adults. Current therapies for GBM are not effective and most tumors recur within months. The development of tumor is associated with deficits of the host's antitumor defense. The goal of immunotherapy is to restore the anti-tumor immune response, and immune checkpoint inhibitors offer the potential to completely eradicate cancer. However, GBM patients respond poorly to immunotherapies because the tumors are characterized by meager infiltration of functional T lymphocytes and NK cells. Myeloid cells accumulating in the GBM (including resident microglia and peripheral macrophages, collectively known as glioma associated myeloid cells - GAMs) are reprogrammed to support the tumor and exert an immunosuppressive effect in the tumor microenvironment. One of the factors responsible for these processes is the SPP1 (secreted phosphoprotein 1) protein secreted by glioma. The aim of this study was to develop new strategies to reactivate the anti-tumor response in malignant gliomas and to sensitize the tumor to the action of anti-PD-1 antibodies. These strategies involve reprogramming the phenotype of GAMs.

Using a syngeneic model of glioma in mice, two therapeutic approaches were employed: i) blocking the activity of arginase 1 (Arg1) using OAT-1746 - a new, potent and selective, small-molecule inhibitor of the enzyme, and ii) preventing the action of Spp1 using a short peptide that blocks the Spp1-integrin interaction. Activation of Arg1 in GAMs leads to depletion of L-arginine, a nutrient required for T and NK cell proliferation, while activation of integrin receptors by Spp1 contributes to the induction of the pro-tumor phenotype of GAMs. The effects of immunomodulators on GL261 glioma growth *in vivo* were assessed using magnetic resonance imaging or the Xtreme intravital imaging. The glioma microenvironment following immunomodulator administration was characterized using multiparametric flow cytometry analysis and transcriptomic profiling (RNAseq) of isolated CD11b⁺ cells. The antitumor efficacy of immunomodulators administered alone or in combination with PD-1 blockade was assessed.

Oral administration of OAT-1746 had no effect on the immune cell composition in the glioma microenvironment, but induced transcriptomic changes in CD11b⁺ cells immunosorted from the brains of inhibitor-treated mice. Administration of OAT-1746 with anti-PD-1 antibody reduced tumor growth. Intratumorally delivered RGD peptide effectively blocked the reprogramming of GAMs towards a glioma-supporting phenotype, but did not affect tumor size. The use of the RGD peptide in combination with the anti-PD-1 antibody changed the composition and functionality of immune cells and enhanced pro-inflammatory responses, which led to a reduction in tumor size. The presented results indicate that the tested immunomodulators change the glioma microenvironment, enable the influx of effector lymphocytes and support the action of immune checkpoint inhibitor immunotherapy.