

Forsøgsprotokol for projektet: "Evaluering af immunresponsen efter vaccination mod sæsoninfluenza"

Formål

Vi ønsker med indeværende projekt at undersøge, hvorledes immunsystemet i raske personer reagerer på vaccination mod influenza. Nærmere bestemt ønsker vi at afgøre, hvorledes udtrykket af immunhæmmende proteiner ændres i ugerne efter vaccination og bestemme, om immunsystemets celler er i stand til at reagere på stimulering med epitoper deriveret fra disse immunhæmmende proteiner. Dette med det langsigtede formål at undersøge muligheden for immunmodulerende vaccination mod immunhæmmende proteiner for at øge effekten af vaccination mod influenza og andre patogener.

Baggrund

Immunsystemet er en selvforsvarsmekanisme, der er skabt gennem evolutionen med det formål at forhindre organismen i at blive invaderet af patogene organismer. Immunsystemet er imidlertid et yderst potent forsvar, og for at forhindre, at immunsystemets komponenter – deriblandt i særdeleshed det adaptive immunforsvar – forårsager vævsskade besidder immunsystemet en række mekanismer, der hæmmer immunsystemets funktion og bremser den inflammatoriske proces.¹ Udover at være i stand til at dræbe mikroorganismer og celler, der er inficeret med sådanne, er immunsystemet også i stand til at dræbe kræftceller.² Imidlertid er det påvist, at kræftceller og andre celler i kræftvæv bremser immunsystemets angreb på kræftcellerne ved at anvende de immunhæmmende mekanismer nævnt ovenfor.³ Således er det påvist, at immunceller, der er i stand til at genkende og dræbe kræftceller bliver bremset i deres angreb på kræftcellerne, fordi kræftcellerne udtrykker proteiner, der hæmmer immuncellernes funktion. Erkendelsen af at kræftceller bruger disse immunhæmmende mekanismer, som et beskyttende skjold, har medført et stort medicinsk gennembrud, idet antistoffer, der blokerer de immunhæmmende mekanismer, gør immunsystemet i stand til at genkende og dræbe kræftcellerne. Disse blokerende antistoffer – benævnt immuncheck-point hæmmere – har revolutioneret behandlingen af såvel modermærkekræft som ikke-småcellet lungecancer og bruges til behandling af adskillige kræftsygdomme nu til dags.⁴

Imidlertid har nyere forskning vist, at adskillige af de mekanismer, som bremser immunsystemets funktion genkendes af immunsystemet selv.⁵⁻¹¹ Således er visse T celler, benævnt anti-regulatoriske T celler, i stand til at genkende og dræbe immunceller, der udtrykker de immunhæmmende proteiner, der bremser immunsystemets funktion.^{12,13} Derved indeholder immunsystemets celler, der både er i stand til at hæmme immunsystemets funktion og celler, der er i stand til at hæmme anti-inflammationen. Disse to modsatte dele af immunsystemet sameksisterer i en delikat balance for at opretholde immunhomøostasen og dermed forhindre, at der på den ene side opstår autoimmunitet, og på den anden side opstår for lav aktivitet af immunsystemet, som derved ville tillade invasive patogener i at slå sig ned i organismen med infektion til følge.¹⁴ Er der således tale om udtalt inflammation i vævet vil indbyggede mekanismer sørge for at opregulere udtrykket af immunhæmmende og anti-inflammatoriske proteiner, hvilket medfører at pro-inflammatoriske immunceller i vævet enten dør eller bliver inaktiveret. Centralt i

denne regulering er de to proteiner indoleamine-1,2-dioxygenase (IDO) og programmed death ligand-1 (PD-L1). I kræftvæv er immunhomøostasen imidlertid sat ud af spil idet kræftcellerne og andre immunhæmmende celler i kræftvævet såsom regulatoriske T-celler, M2 makrofager, myeloidt derivede suppressorceller og cancer associerede fibroblaster overudtrykker de immunhæmmende proteiner deriblandt IDO og PD-L1.¹ Nyere forskning har imidlertid vist, at immunsystemets indbyggede evne til at angribe og dræbe immunhæmmende celler kan bruges til medicinsk kræftbehandling ved at vaccinere mod de immunhæmmende mekanismer såsom IDO og PD-L1. Selvom virkningsmekanismen for disse vacciner endnu ikke er fuldt klarlagt, så tyder resultater på, at vaccinerne øger det allerede eksisterende anti-regulatoriske T-celle respons i patienten.^{8,15-17} De af vaccinen aktiverede anti-regulatoriske T-celler infiltrerer kræftvævet, dræber de immunhæmmende celler ved at genkende epitoper fra IDO og PD-L1, som præsenteres på HLA-komplekser af de immunhæmmende celler, hvorved disse dræbes. Således reverteres det anti-inflammatoriske miljø i tumor-mikromiljøet, inflammationen i kræftvævet øges, og de tumor specifikke T-celler kan nu slå kræftcellerne ihjel.

Selvom disse immunhæmmende mekanismer kan synes ufordelagtige for organismen, så er de som benævnt en naturlig del af immunreguleringen og således vigtige for at forhindre autoimmun sygdom og kroniske inflammatoriske lidelser. Imidlertid er denne immunregulering også vigtig i forbindelse med infektion. Ved infektion i et givent væv, vil stimuli primært medieres af celler i det innate immunforsvar, mediere en kraftig influx af immunceller, deriblandt T-celler, i det inficerede område. Immuncellerne vil efter en tid have dræbt mikroorganismene, hvorfor der ikke længere er behov for inflammation i vævet. Denne anti-inflammation medieres af de ovenfor nævnte immunhæmmende mekanismer såsom IDO og PD-L1, der udtrykkes i inflammert væv. IDO og PD-L1 samt andre immunhæmmende proteiner såsom og transforming growth factor-beta (TGFβ) er således helt centrale for at hæmme inflammationen efter en infektion.¹⁸ Selvom denne hæmning af immunsystemet er fordelagtig i langt de fleste tilfælde mener vi, at en forøget inflammation ved infektion i nogle tilfælde kan være fordelagtig, idet ikke alle infektioner clears fuldt ud og i stedet går i en såkaldt latent fase og kan reaktivere ved en senere lejlighed. Dette fænomen gælder i særdeleshed herpesvirus.¹⁹

Profylaktisk vaccination mod patogener udgør et af de største medicinske gennembrud og disse vacciner bruges i dag med stor succes for at forhindre udbrud af infektionssygdomme. De fleste vacciner gives som en del af børnevaccinationsprogrammet, hvorimod andre vacciner administreres afhængig af sæsonens variant. En af disse årlige vacciner er influenzavaccinen, som administreres én gang årligt til udvalgte målgrupper såsom kronisk syge og personer over 65 år.²⁰ Idet effekten af influenzavaccinen varierer fra år til år og i visse år langt fra effektivt beskytter mod smitte og svær sygdom ønsker vi undersøge muligheden for at øge effekten af denne vaccination.

Ved vaccination indtræder der en lokal inflammation i det vaccinerede væv – en effekt, der er medieret af vaccinens adjuvans.²¹ Denne inflammation kan sammenlignes med inflammationen ved infektion, og de immunhæmmende mekanismer, der opreguleres ved infektion, mener vi således også opreguleres ved vaccination. Idet de immunhæmmende mekanismer som IDO og PD-L1 opreguleres ved vaccination, tror er vi af den overbevisning, at frekvensen af anti-regulatoriske T-celler, som er specifikke for IDO og PD-L1 og andre immunhæmmende mekanismer, øges i det perifære blod. Vi ønsker således at undersøge, om udtrykket af immunhæmmende mekanismer øges i forbindelse med vaccination mod influenza og afklare, om antallet T-celler specifikke for disse immunhæmmende mekanismer øges i det perifære blod. Dette vil gøre os meget klogere på, hvorledes de anti-regulatoriske mekanismer i immunsystemet reagerer på vaccination mod patogener, og vil gøre os i stand til at vurdere, hvorvidt der i fremtiden er mulighed for at

foretage immunmodulerende vaccination samtidig med vaccination mod patogener, med henblik på at øge effekten af den patogen-specifikke vaccination.²²

Hypoteser

1. Udtrykket af immunhæmmende proteiner og regulatoriske celler i perifært blod øges efter vaccination mod influenza.
2. Mængden af anti-regulatoriske T-celler, som er specifikke over for IDO, PD-L1 og andre immunhæmmende mekanismer stiger efter vaccination mod influenza.
3. Jo højere et anti-regulatorisk T-celle respons der ses, desto højere immunrespons rejses der mod influenzavirus.

Metode

Vi ønsker at analysere immunceller hos forsøgspersonerne at afgøre, om udtrykket af immunhæmmende proteiner ændrer sig efter vaccination mod sæsoninfluenza og afgøre, om immunresponsen mod epitoper fra disse immunhæmmende proteiner ændres efter vaccination mod sæsoninfluenza. Derudover ønsker vi at afgøre, om et kraftigt immunrespons mod immunhæmmende mekanismer øger det influenza-specifikke immunrespons. Der udtages en blodprøve på i alt 100 mL blod fra alle forsøgspersoner maksimalt to dage før vaccination mod sæsoninfluenza. Derefter udtages endnu én blodprøve på i alt 100 ml blod, to til seks uger efter vaccination. Derefter udtages ikke flere blodprøver. De hvide blodlegemer oprenses fra det udtagne blod, og disse hvide blodlegemer vil blive anvendt til immunologiske forsøg mhp. at klarlægge, hvorvidt forsøgspersonen har et immunrespons mod immunhæmmende proteiner. Desuden fraktioneres også plasma og serum fra det udtagne blod til analyse af specifikke antistoffer. De laboratiemæssige metoder til analyse vil være Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT), enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) og fluorescence activated cell sorting (FACS). Forskellen mellem immunresponsen og udtrykket af immunhæmmende proteiner sammenlignes og immunresponsen mod IDO, PD-L1 mfl. korreleres med det influenza-specifikke immunrespons. Analyserne vil foregå på Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Herlev Hospital og Institut for Immunologi og Mikrobiologi, Københavns Universitet.

Biobank

Straks efter udtagelse af det biologiske materiale, vil de hvide blodlegemer blive isoleret vha. oprensning med Lymphoprep og serum samt plasma vil ligeledes blive isoleret. Nogle immunceller anvendes allerede på dette tidspunkt til forsøg, mens de resterende celler vil blive frosset ned og komme til at indgå i en forskningsbiobank på Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Herlev Hospital. Årsagen til, at der oprettes biobank er, at vi ønsker at følge de første forsøgsresultater op med yderligere forsøg, men også fordi det ikke er muligt at anvende alt materialet på én gang. Prøverne vil på udtagelsestidspunktet blive pseudonymiseret. Materialet, der indgår i denne forskningsbiobank, vil udelukkende blive brugt til forsøg, der indgår i indeværende forskningsprojekt. Forsøgets opstartes den 1. september 2025 og afsluttes den 31. august 2027. Såfremt der er materiale til overs i biobanken efter afslutning af projektet den 31. august 2027, vil vi ansøge Datatilsynet om oprettelse af en ny biobank med det overskydende materiale til brug for fremtidig forskning. Et sådant nyt forskningsprojekt vil kræve selvstændig godkendelse fra Videnskabsetisk Komité. Databeskyttelsesreglerne vil fortsat blive overholdt såfremt biologisk materiale videregives til denne biobank. Hvis forsøgspersonerne ikke ønsker videregivelse til denne biobank, vil deres materiale blive destrueret ved afslutning af indeværende projekt, hvilket vil sige senest den 31. august 2027.

Procedure for pseudonymisering af prøver

Prøverne bliver navngivet efter projektets identificeringsbogstaver, der er FLU. Prøve fra første patient bliver herefter kaldt FLU-1, prøver fra anden patient bliver kaldt FLU-2 osv. Således er der ingen personhenførbare data på materialet.

Statistiske analyser og styrkeberegning

Det primære effektmål er binært (vaccinations respons). På baggrund af tidligere erfaring og biologisk plausibilitet forventes en responsrate på 30%. Vi sammenligner dette med en nulhypotese om en baggrundsresponsrate på 5%, svarende til ingen reel effekt. Med et signifikansniveau på 0.05 og ønsket power på 80% er det beregnet, at 30 patienter er tilstrækkeligt til at kunne påvise denne forskel (beregnet power = 81%). **Forsøgspersoner samt in- og eksklusionskriterier**

Vi ønsker at udtage 100 mL blod af to omgange med to til seks ugers mellemrum fra i alt 30 raske forsøgspersoner.

Inklusionskriterier:

- Alder ≥ 18 år og < 80 år.
- Myndig habil forsøgsperson, der er i stand til at modtage og forstå skriftlig og mundtlig information om projektet.
- Planlagt til vaccination mod sæsoninfluenza inden for kommende to dage efter første blodprøve til projektet.

Eksklusionskriterier:

- Tidligere kræftsygdom (non-melanom hudkræft dog ikke eksklusionskriterie)
- Tidligere eller aktiv bindevævssygdom
- Modtaget organtransplantation eller knoglemarvstransplantation
- Aktiv infektionssygdom såsom forkølelse eller halsbetændelse.
- Medicinering med medicin, der kan ændre immunsystemets sammensætning, fx binyrebarkhormon eller immunmodulerende behandling.

Risici bivirkninger og ulemper

Risikoen ved at få taget blodprøve er meget lille og beror på risiko for infektion og risiko for blødning. Huden afsprittes inden blodprøvetagning, og forsøgspersonen bliver informeret om at trykke på punktursted i to minutter efter kanylen er taget ud. Forsøgspersonen informeres om tegn på blødning og infektion, og om, at han/hun bør søge egen læge i tilfælde af dette.

Oplysninger fra patientjournaler

Der anvendes ingen oplysninger fra patientjournaler i dette projekt.

Respekten for forsøgspersonernes fysiske og mentale integritet samt privatlivets fred

Respekten for forsøgspersonernes fysiske og mentale integritet samt privatlivets fred vil blive overholdt og ligeså vil lov om behandling af personoplysninger blive overholdt. Prøverne vil på udtagelsestidspunktet

blive pseudonymiseret og derfor skal ovenstående projekt, jf. gældende lovgivning ikke anmeldes til Datatilsynet, men anmeldes til Privacy. Databeskyttelsesforordningen og databeskyttelsesloven overholdes.

Offentliggørelse af forsøgsresultater

Både positive, negative og inkonklusive resultater vil blive offentliggjort. Resultaterne af undersøgelserne vil søges publiceret i internationale tidsskrifter med *peer review*. Kan resultaterne ikke publiceres vil de blive offentliggjort på hjemmesiden for Institut for Klinisk Medicin, Københavns Universitet.

Økonomi

Initiativtager til projektet er professor, centerleder, dr. med. et dr. tech Mads Hald Andersen, Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Onkologisk Afdeling, Herlev-Gentofte Hospital. Den forsøgsansvarlige er læge, PhD, Morten Orebo Holmström, Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Onkologisk Afdeling, Herlev-Gentofte Hospital. Hverken initiativtager eller forsøgsansvarlige modtager vederlag for gennemførelse af forsøget.

Budget

Udgiftspost	Beløb	Finansiering
Blodprøveudstyr	5.000,-	Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Herlev-Gentofte Hospital
Laboratorieanalyser	50.000,-	Nationalt Center for Cancer Immunoterapi, Herlev-Gentofte Hospital
Total	55.000,-	

Vederlag

Der gives ikke vederlag til forsøgspersonerne.

Etiske aspekter

Der ingen større risiko forbundet ved deltagelse i projektet, da eneste intervention er udtagelse af blodprøve. Risikoen ved dette er meget lille (se under "Risici, bivirkninger og ulemper"). Projektet vil give oplysninger om, hvorvidt den enkelte forsøgspersons immunsystem reagerer på influenzavaccination, og hvorledes immunsystemet reagerer på stimulering med epitoper fra immunhæmmende mekanismer. Det vides ikke på nuværende tidspunkt, hvorvidt dette er fordelagtigt eller ej for den enkelte person.

Rekrutteringsmateriale, rekruttering af deltagere og forløb for indhentelse af informeret samtykke

Forsøgspersoner rekrutteres blandt ansatte på Onkologisk Afdeling, Herlev-Gentofte Hospital. Alle ansatte på afdelingen bliver, som en del af smitteforebyggelse, hvert år tilbudt vaccination mod sæsoninfluenza. Der bliver informeret om projektet ved morgenkonference eller lignende møder på afdelingen af læge Morten Orebo Holmström, og forsøgspersonerne kan herefter stille spørgsmål til projektet, og det skriftlige informationsmateriale udleveres herefter. Ved disse overordnede informationsmøder informeres om retten til en bisidder til samtale i enmandsrum. Der afsættes desuden tid til, at forsøgspersonerne kan

konsultere forsøgsansvarlige i enmandsrum, og ved denne samtale oplyses om retten til 24 timers betænkningstid .

Oplysninger om erstatningsordning

Forsøget er omfattet af patienterstatningen.

Referencer

1. Goldmann, O., Nwofor, O. V., Chen, Q. & Medina, E. Mechanisms underlying immunosuppression by regulatory cells. *Frontiers in Immunology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1328193> (2024).
2. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329–360 (2004).
3. Roerden, M. & Spranger, S. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2025) doi:10.1038/s41577-024-01111-8.
4. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* 8, 1069–1086 (2018).
5. Ahmad, S. M., Borch, T. H., Hansen, M. & Andersen, M. H. PD-L1-specific T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* vol. 65 797–804 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1783-4> (2016).
6. Martinenaite, E. *et al.* CCL22-specific T Cells: Modulating the immunosuppressive tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 5, (2016).
7. Martinenaite, E. *et al.* Frequent adaptive immune responses against arginase-1. *Oncoimmunology* 7, e1404215 (2017).
8. Bendtsen, S. K. *et al.* Peptide vaccination activating Galectin-3-specific T cells offers a novel means to target Galectin-3-expressing cells in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 11, (2022).
9. Munir, S. *et al.* Natural CD4 + T-cell responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLoS One* 7, e34568 (2012).
10. Weis-Banke, S. E. *et al.* The metabolic enzyme arginase-2 is a potential target for novel immune modulatory vaccines. *Oncoimmunology* 9, 1771142 (2020).
11. Orebo Holmström, M. *et al.* Cytotoxic T cells isolated from healthy donors and cancer patients kill TGFbeta expressing cancer cells in a TGFbeta dependent manner. *Cell Mol Immunol* Accepted f, (2020).
12. Andersen, M. H. Anti-regulatory T cells. *Semin Immunopathol* 39, 317–326 (2017).
13. Ødum, N. Anti-regulatory T cells are natural regulatory effector T cells. *Cell Stress* 3, 310–311 (2019).

14. Andersen, M. H. Immune Regulation by Self-Recognition: Novel Possibilities for Anticancer Immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 107 1–8 Preprint at <https://doi.org/10.1093/jnci/djv154> (2015).
15. Jørgensen, M. A. *et al.* Arginase 1–Based immune modulatory vaccines induce anticancer immunity and synergize with Anti–PD-1 checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 9, 1316–1326 (2021).
16. Perez-Penco, M. *et al.* TGF β -derived immune modulatory vaccine: targeting the immunosuppressive and fibrotic tumor microenvironment in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunother Cancer* 10, (2022).
17. Munir Ahmad, S. *et al.* PD-L1 peptide co-stimulation increases immunogenicity of a dendritic cell-based cancer vaccine. *Oncoimmunology* 5, e1202391 (2016).
18. Sarikonda, G. & von Herrath, M. G. Immunosuppressive Mechanisms During Viral Infectious Diseases. in 431–447 (2010). doi:10.1007/978-1-60761-869-0_27.
19. Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357, 1513–1518 (2001).
20. Influenzavaccination. <https://www.ssi.dk/vaccinationer/influenzavaccination>.
21. Hollingsworth, R. E. & Jansen, K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines* 4, 7 (2019).
22. Andersen, M. H. Immune modulatory vaccines: time to move into infectious diseases. *Lancet Microbe* 4, e4–e5 (2023).