

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28731> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Majowicz, Anna

**Title:** Addressing immune tolerance issues in inflammatory bowel disease and adeno-associated virus based gene transfer

**Issue Date:** 2014-09-17

# Addendum



## Samenvatting

### Inductie van immuun tolerantie in inflammatoire darmziekten en tegen adeno-geassocieerde virussen (AAV)

Dit proefschrift bestaat uit twee delen. **Deel I** is gericht op de ontwikkeling van nieuwe strategieën voor het behandelen van inflammatoire darmziekten (IBD). In een experimenteel IBD model, werd een immuun tolerantie bereikt door gebruik te maken van *in vitro* gegenereerde regulatoire T cellen. Ook werd, met behulp van een AAV vector, een methode ontwikkeld om regulatoire T cellen *in vivo* te induceren. Deze inductie van regulatoire T cellen ging gepaard met het onderdrukken van ontsteking in een experimenteel IBD model.

Het is mogelijk dat een immuunreactie ontstaat tegen de AAV capside, of tegen het AAV transgen. Dergelijke reacties zouden succesvolle gentherapeutische toepassingen in de weg staan. Het onderzoek beschreven in **Deel II** van dit proefschrift is gericht op tolerantie inductie voor deze factoren om behandeling met de AAV vector als onderdeel van een gentherapie strategie, efficiënter te maken.

#### Deel I

Inflammatoire darmziekten zijn aandoeningen die gepaard gaan met chronische ontstekingen in het maagdarmkanaal en waarvoor geen curatieve behandelingen beschikbaar zijn. Behandelstrategieën, die gebruik maken van cel-, of gentherapie, zijn in recent onderzoek succesvol gebleken in het onderdrukken van ontsteking en zodoende hoopgevend voor de behandeling van IBD. In dit verband is de regulatoire T cel (Treg) een veelbelovende celpopulatie. Treg cellen zijn in staat om immuun reacties te doen afnemen en aldus balans in het maagdarmkanaal te doen terugkeren. Een probleem is dat de beschikbaarheid van natuurlijke Treg (nTreg) cellen erg beperkt is. Ook is het fenotype profiel niet stabiel genoeg voor ontwikkelingen *ex vivo*. Voorts laat de Treg cel zich niet makkelijk vermenigvuldigen *in vitro*. Daarom biedt het *in vitro* genereren van regulatoire T cel vanuit naïeve T cellen een goed alternatief voor de toekomst om deze obstakels te overwinnen. Op het moment zijn diverse strategieën beschikbaar om Treg te induceren *in vitro*. Echter, ieder van deze strategieën kent

zijn beperkingen en het is tot op heden nog niet gelukt om *in vitro* geïnduceerde Treg cellen te gebruiken in de kliniek. Het doel van deel I van dit proefschrift was zodoende om een nieuwe methode te ontwikkelen om Treg cellen *in vitro* te kunnen produceren. **Hoofdstuk 2** beschrijft een activatie protocol, waarmee op een eenvoudige wijze, Treg cellen worden gegenereerd vanuit naïeve T cellen *in vitro*. Deze Treg (TregPMA) cellen, remmen de proliferatie van geactiveerde leukocyten in een zogenaamde *mixed leukocyte reaction* (MLR), op een dosis afhankelijk wijze. In **Hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat dit protocol ook werkzaam is voor naïeve muis T cellen en dat de gegenereerde TregPMA cellen functioneel zijn *in vivo*, in een experimenteel IBD model. In **Hoofdstuk 4** wordt gebruik gemaakt van een strategie om Treg cellen te induceren *in vivo*. Met behulp van een AAV vector wordt een eiwit in een experimenteel IBD model tot expressie gebracht, te weten een Treg epitoom (167). Met behulp van deze AAV vector kon de ontsteking in de darm worden verminderd. Bovendien ging dit gepaard met een toename van het aantal Treg cellen in de behandelde groep muizen.

## Deel II

Een belangrijk obstakel voor gentherapie met behulp van op AAV gebaseerde virale vectoren, is een humorale immuun reactie tegen de AAV capside. Neutraliserende antilichamen (NAB), die ontstaan als reactie op blootstelling aan “wild type” AAV of na behandeling met een recombinant AAV vector, voorkomen herhaalde blootstelling aan de AAV en maken zodoende een volgende gentherapie behandeling minder efficiënt. **Hoofdstuk 6** beschrijft een methode waarbij het alternerend toedienen van AAV serotype 1 en serotype 5, zogenaamde readministratie, wel mogelijk maakt. Daarnaast beschrijft **Hoofdstuk 7** diverse immuun suppressie strategieën, die de humorale immuunreactie tegen de primaire AAV vector doen afnemen. Een bijkomende zorg voor gentherapie met behulp van op AAV gebaseerde virale vectoren is de mogelijkheid dat een immuunreactie tegen het transgen product ontstaat, hetgeen zou kunnen leiden tot verlies van therapeutisch potentieel van het gentherapie product. **Hoofdstuk 8** beschrijft een methode, die gebruik maakt van mir-142-3p expressie om immuunreacties tegen het transgeen product te voorkomen.

## Streszczenie

### Adresowanie problemów tolerancji immunologicznej w nieswoistym zapaleniu jelit oraz transferze genów przy pomocy wirusów towarzyszących adenowirusom (AAV)

Obecna praca doktorska składa się z dwóch części, które dotyczą problemów tolerancji immunologicznej w nieswoistym zapaleniu jelit oraz transferze genów przy pomocy wirusów towarzyszących adenowirusom. Badania opisane w **Części I** dotyczą rozwoju strategii leczenia nieswoistego zapalenia jelit. Osiągnęliśmy indukcję tolerancji immunologicznej w mysim modelu nieswoistego zapalenia jelit przy użyciu limfocytów T regulatorowych (Treg) uzyskanych poprzez specyficzną aktywację limfocytów T naiwnych *in vitro*. Ponadto, wykazaliśmy również, iż limfocyty Treg są indukowane *in vivo* poprzez AAV dostarczające specyficzny gen i przywracają jelitową tolerancję immunologiczną. W odniesieniu do stosowania wektorów AAV, w **Części II** niniejszej pracy opisane są badania, które mają na celu zaadresowanie problemów dotyczących indukcji tolerancji immunologicznej wobec kapsydów wektorów AAV oraz transgenów dostarczonych za pomocą wektorów AAV.

### Zarys Części I

Rozwój nowych strategii leczenia chorób nieswoistego zapalenia jelit, które są uważane za grupę chorób autoimmunologicznych, ma duże znaczenie, gdyż obecnie nie ma dla tych chorób skutecznej terapii. Terapia komórkowa oraz terapia genowa były ostatnio wykorzystywane do badań, których celem była inhibicja stanu zapalnego przewodu pokarmowego. Treg mają zdolność tłumienia odpowiedzi immunologicznej oraz utrzymania centralnej równowagi immunologicznej. Dzięki temu, limfocyty Treg, mogą zapobiegać powstawaniu stanów zapalnych poprzez indukcję tolerancji immunologicznej. Głównym ograniczeniem dla terapeutycznego użytkowania naturalnych limfocytów Treg (nTreg) jest ich mała dostępność oraz niestabilny fenotyp podczas ich ekspansji *ex vivo*. Dlatego też zastosowanie indukowanych limfocytów Treg (iTreg) jest dobrą alternatywą. Obecnie, istnieje kilka technik służących do wytwarzania limfocytów iTreg, jednakże każda z tych technik ma pewne ograniczenia. W związku z tym, wprowadzenie nowych, ulepszonych technik do wytwarzania

limfocytów iTreg, jest bardzo interesujące. Celem eksperymentów opisanych w **Rozdziale 2** było stworzenie nowego, prostego sposobu wytwarzania *in vitro* funkcjonalnych i stabilnych limfocytów iTreg z ludzkich CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> komórek. Wygenerowane limfocyty iTreg (TregPMA) okazały się być funkcjonalne *in vitro* w mieszanej hodowli limfocytów (MLR), gdyż tłumili proliferację komórek biorcy w sposób zależny od dawki. Protokół generacji limfocytów TregPMA *in vitro* został również zastosowany z użyciem komórek mysich. Jest to opisane w **Rozdziale 3**. Funkcjonalność wygenerowanych limfocytów iTreg została zobrazowana poprzez złagodzenie zapalenia jelita w mysim modelu nieswoistego zapalenia jelita.

Pośród niedawno podejmowanych badań naukowych, które mają na celu wygenerowanie limfocytów iTreg są badania, które użytkują terapię genową i komórkową. W **Rozdziale 4**, zbadana została metoda indukcji limfocytów Treg *in vivo* poprzez wprowadzenie do komórek pewnego genu. Dostarczenie regulatorowego epitopu 167 limfocytów T (Tregitope 167) za pomocą wektora AAV, wykazało indukcję limfocytów Treg *in vivo* i złagodzenie eksperymentalnego zapalenia jelita. To badanie wykazało, że dostarczenie przeciwwzapalnego Tregitope za pomocą wektora AAV powoduje indukcję tolerancji immunologicznej przez limfocyty Treg, co w konsekwencji może być użyte do leczenia chorób o podłożu autoimmunologicznym i zapalnym.

## Zarys Części II

Główną przeszkodą w dostarczaniu genów za pomocą wektora AAV jest humoralna odpowiedź immunologiczna skierowana przeciw białkom kapsydu AAV, która pojawia się po pierwszej infekcji wektorem AAV. Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciw kapsydom AAV blokują ponowną transdukcję tym samym serotypem AAV. W **Rozdziale 6** zademonstrowaliśmy na mysim modelu, iż można skutecznie dostarczyć gen z użyciem wektora AAV serotypu 5 a następnie ponownie dostarczyć inny gen z użyciem wektora AAV serotypu 1, gdyż przeciwciała neutralizujące skierowane przeciw białkom kapsydów wektora AAV serotypu 5 nie hamują transdukcji za pomocą wektora AAV serotypu 1. W **Rozdziale 7** zbadaliśmy zdolność różnych kombinacji środków immunosupresyjnych do obniżenia poziomu krążących we krwi

przeciwciał neutralizujących przeciwko kapsydom wektorów AAV, które pojawiają się po pierwszym podaniu wektora AAV. Celem tego badania było określenie strategii leczenia immunosupresyjnego oraz ram czasowych, w których obniżenie poziomu przeciwciał neutralizujących przeciwko kapsydowi wektora AAV umożliwi ponowne podanie wektora AAV.

Innym problemem w terapii genowej przy zastosowaniu wektorów AAV jest możliwość odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw produktom transgenów. Ta reakcja immunologiczna może doprowadzić do utraty ekspresji terapeutycznego transgenu. Dlatego też, istnieje zapotrzebowanie na określenie metod, które doprowadzą do indukcji tolerancji immunologicznej wobec białka transgenu. W **Rozdziale 8**, opisaliśmy możliwość zastosowania sekwencji targetowych mir-142-3p w celu uniknięcia reakcji immunologicznej przeciw produktowi transgenu, po domięśniowym dostarczeniu wektora AAV.



## Curriculum Vitae

Anna Majowicz was born on 16th of August 1983 in Krosno, Poland. She lived in Rzeszów (Poland) where in 2002 she completed High School (I Liceum Ogólnokształcące). In October 2002 she moved to Kraków (Poland) where she started Biology studies at Jagiellonian University. In 2007 she completed the studies and obtained MSc in Biology title. In February 2008 she arrived in Amsterdam (The Netherlands) where she started an internship at Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT, currently uniQure). After completing the internship, she was enrolled in a PhD program at Leiden University Medical Center while working in Immunology group at AMT/uniQure. The work presented in this thesis was performed at AMT/uniQure. Following the end of her PhD thesis she started working as a Junior Scientist in Immunology group at uniQure.

## List of publications

**Majowicz, A.**, Maczuga, P., Kwikkers, K. L., van der Marel, S., van Logtenstein, R., Petry, H., van Deventer, S. J. H., Konstantinova, P., and Ferreira, V. (2013). Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J. Gene Med.* *15*, 219-232.

**Majowicz, A.**, van der Marel, S., te Velde, A. A., Meijer, S. L., Petry, H., van Deventer, S. J. H., and Ferreira, V. (2012). Murine CD4(+)CD25(-) cells activated in vitro with PMA/ionomycin and anti-CD3 acquire regulatory function and ameliorate experimental colitis in vivo. *BMC Gastroenterol.* *12*, 172.

van der Marel, S., **Majowicz, A.**, Kwikkers, K. L., van Logtenstein, R., te Velde, A. A., De Groot, A. S., Meijer, S. L., van Deventer, S. J. H., Petry, H., Hommes, D. W., and Ferreira, V. (2012). Adeno-associated virus mediated delivery of Tregitope 167 ameliorates experimental colitis. *World J. Gastroenterol.* *18*, 4288-4299.

van der Marel, S., **Majowicz, A.**, van Deventer, S. J. H., Petry, H., Hommes, D. W., and Ferreira, V. (2011). Gene and cell therapy based treatment strategies for inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* *2*, 114-122.

## Acknowledgements

Here, I would like to express my gratitude to all the people without whom this book and lots of “good days in science” would have never happened. I would like to acknowledge my promotor, **Prof. Sander van Deventer** and thank him for taking me in as an intern in AMT where later I became his PhD student. I was always inspired and impressed by your enthusiasm and achievements. I would like to thank to **Dr. Harald Petry**, one of my co-promotors. Dear Harald, you interviewed me together with Sander and showed me around the AMT for the first time. Thank you for believing in me and supporting me later on my PhD pathway. I would like to thank to my second co-promotor, **Dr. Valerie Sier-Ferreira**, head of the Immunology group in AMT/uniQure. Dear Valerie, thank you for being there for me every step of the way, fruitful discussions, manuscript writing sessions and sharing your wisdom with me. In Immunology group I was lucky to work with one of the most cheerful people I have ever met, my paranymph- **Karin**. Dear Karin, it was and it continues to be a pleasure to work with you. Thank you for sharing your scientific knowledge as much as for supporting me on the “mental” level. Your beautiful singing and sense of humor always helped us to survive super long and tropical hours in the R-North. I would also like to thank to **Sander van der Marel, MD, PhD** for always making me smile. I am very glad that we worked together. I will always remember those great times and I wish you all the best in your medical career. **Angelina**, you were the person who took me along to the AMT laboratory for the first time. Thank you for your enthusiasm and helpful word. In my big number of *in vivo* experiments I could always count on very skilled hands of **Richard**. It was always a pleasure to work in an animal facility together with you. Huge thanks for staying many times for long hours of crushing tissue sessions with me and Karin in R-North. **Bas Blits**, thank you for being always helpful with DEC protocols corrections and animal experiments advices. During my time in AMT I also met **Stuart** who I thank for all support and especially for being a friend to me. **Eric**, with you I produced my first baculoviruses and my first AAVs. You were a great teacher and I really enjoyed working with you. **Piotr**, we met when we were subscribing for the courses before starting the first year of Biology studies in Kraków. We became friends and I would have not

been in Amsterdam if it was not for you. Thank you for letting me know that there was a possibility to apply for an intern position in AMT. **Chantal**, thank you for all your support and for being my friend. My work could progress and bloom thanks to many more current and former colleagues from AMT/uniQure who supported me with their scientific and technical advices and skills: **Annemart, Astrid, Bart, Bas Bosma, Betty, Bob, Christian, Corina, Dylan, Eelke, Florie, Frans, Gert Jan, Huining, Kimberly, Lizzy, Jaap, Jacek, Jani, Jeroen M., Jeroen V., Jolanda, Larbi, Maarten, Niccolò, Pavlina, Saskia, Sherwin, Stephan** and **Yvet**. Thank you all. For helping me with writing the Dutch summary of my thesis I would like to thank **Sander, Karin** and **Sumiati**. I would also like to thank **Anje te Velde** with whom I worked on the mouse IBD model experiments. Thank you for your time and IBD expertise input in the TregPMA project. **Leonardo**, I will always be grateful to the Universe that I run into you. You are my best friend. Thank you for your time, words of wisdom and advices about the book cover and esthetics of its layout. I would like to thank very much to **Francis and Jennie Olender** for their support and help with printing this thesis. I would like to thank from the bottom of my heart to my brother **Krzysztof** who is my second paranymph. You always supported me on my scientific pathway. During my studies I lived in your amazing apartment in Krakow and when I went to Amsterdam and enrolled to PhD program you were very caring and helped me in many ways. Your constant interest in “all subjects of the world” has always inspired me and I admire you for that! I keep receiving dozens of links from you on regular basis about the new scientific discoveries that none of my science friends did not even hear about yet! Na końcu, chciałabym z całego serca podziękować moim kochanym rodzicom. **Mamo** i **Tato** dziękuję Wam za wychowanie, wsparcie i dobre rady przez całe moje życie. Jestem dumna, że jesteście moimi rodzicami!

## List of abbreviations

AAV	Adeno-associated viruses
Ab	Antibody
APC	Antigen presenting cell
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
QA/QC	Quality assurance/ Quality control
CCMO	Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
CD	Crohn's disease
cDNA	Coding deoxyribonucleic acid
CMV	Cytomegalovirus
CRP	C reactive protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAI	Disease activity index
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Fragment, antigen binding region
Fc	Fragment, crystallizable region
FBS	Fetal bovine serum
Foxp3	Forkhead Box-P3
Gc	Genome copy
GI	Gastro-intestinal
GFP	Green fluorescent protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein

GMP	Good Manufacturing Practices
HE	Haematoxylin and eosin
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells transformed by DNA from human adenovirus type 5
IBD	Inflammatory bowel disease(s)
ICOS	Inducible co-stimulator
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IS	Immuno-suppression
iTreg	Induced regulatory T cell
IVIG	Intravenous immunoglobulin
Max	Maximum
MHC	Major Histocompatibility complex
Min	Minimum
miRNA	Micro RNA
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MSC	Mesenchymal stromal cells
NAB	Neutralizing antibodies
NOD/SCID	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
nTreg	naturally occurring regulatory T (cells)
OVA	Ovalbumin
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
rAAV	Recombinant adeno-associated viruses

R&D	Research and Development
RLU	Relative luminescence unit
RNA	Ribonucleic acid
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
TCR	T cell receptors
T1D	Type 1 diabetes
TNBS	Trinitrobenzene sulfonate
TNF	Tumor Necrosis Factor
Teff	Effector T (cells)
Treg	Regulatory T (cells)
Tregitope	Regulatory T cell epitope
TregPMA	iTreg cells induced by PMA/ionomycin/antiCD3/IL-2
UC	Ulcerative colitis
WPRE	Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional enhancer
Wk	Week