



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design of novel TCR gene transfer strategies for the treatment of hematological malignancies

Veken, L.T.J.N. van der

Citation

Veken, L. T. J. N. van der. (2009, September 8). *Design of novel TCR gene transfer strategies for the treatment of hematological malignancies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13964>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13964>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

A grayscale microscopic image of a cell culture, showing numerous small, rounded cells with distinct nuclei and some elongated, spindle-shaped cells. The cells are densely packed and appear to be in various stages of growth or division.

7

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Hematopoïese en leukemie

In het beenmerg vindt de vorming van nieuwe bloed- en afweercellen plaats in een proces dat hematopoïese genoemd wordt. Uit hematopoïetische stamcellen ontstaan o.a. rode bloedcellen (zuurstof transport), bloedplaatjes (bloedstolling) en witte bloedcellen (afweercellen). Bij de witte bloedcellen kan onderscheid worden gemaakt in B cellen (antistof productie), T cellen en natural killer (NK) cellen en deze cellen beschermen ons op verschillende manieren tegen infecties van o.a. bacteriën en virussen. Wanneer de aanmaak van bloedcellen uit een hematopoïetische stamcellen ontspoord en leidt tot ongecontroleerde delingen, wordt er gesproken van leukemie (bloedkanker). De normale bloedcellen worden dan uit het beenmerg verdrongen door de kwaadaardige (maligne) cellen en komen in grote aantallen in het bloed terecht.

Stamceltransplantatie

De wijze van behandeling van de leukemie hangt af van de ontwikkelingsrichting, het ontwikkelingsstadium en de delingssnelheid van de maligne cellen. Een aantal typen leukemie wordt behandeld met stamceltransplantatie (SCT). De hematopoïetische stamcellen kunnen afkomstig zijn van de patiënt zelf (autologe stamcellen) of van een gezonde donor (allogene stamcellen). In het laatste geval wordt het hematopoïetisch systeem van de patiënt vervangen door dat van een donor. Om celdelingen van allogene stamcellen in de patiënt mogelijk te maken en om afstoting van het stamceltransplantaat te voorkomen wordt het eigen hematopoïetische systeem van de patiënt eerst vernietigd met behulp van radio- en/of chemotherapie. Dit proces, dat conditionering genoemd wordt, zorgt gedeeltelijk voor vernietiging van de leukemiecellen.

Het grootste aandeel in de vernietiging van de leukemiecellen na SCT wordt toegeschreven aan de T cellen (T lymfocyten) die aanwezig zijn in het stamceltransplantaat van de gezonde donor. Na SCT treedt er in de patiënt een immunoreactie op die gebaseerd is op de reactiviteit van de donor-T-cellen en gericht is tegen de resterende bloedcellen, waaronder leukemiecellen, van de patiënt. Omdat het stamceltransplantaat van de donor het hematopoïetische systeem van de patiënt vervangt leidt dit niet tot problemen, maar is deze reactiviteit juist curatief.

Immunotherapie

Wanneer uit het stamceltransplantaat de T cellen worden verwijderd vergroot dit de kans op terugkeer (recidief) van de leukemie. Dit toont aan dat de T cellen in het transplantaat in staat zijn om de leukemiecellen te herkennen die na conditionering nog aanwezig kunnen zijn. Deze reactiviteit wordt graft-versus-leukemia (GVL) reactiviteit genoemd. Naast de gewenste GVL reactiviteit kan er ook reactiviteit zijn van de donor T cellen die gericht is tegen gezonde weefsels en organen van de patiënt. De donor T cellen herkennen dan de gezonde cellen van de patiënt als lichaamsvreemd wat vervolgens leidt tot graft-versus-host-disease (GVHD). Bij de behandeling van leukemie wordt er dus geprobeerd om zo veel mogelijk GVL reactiviteit te induceren terwijl GVHD wordt beperkt. Een strategie om dit te bereiken is het toedienen van een stamcel transplantaat waaruit de T cellen zijn verwijderd. Het hematopoïetisch systeem van de patiënt kan zo worden vervangen en zonder T cellen treedt er geen GVHD op. Na een aantal maanden worden er

vervolgens donor lymfocyten infusies (DLI) toegediend om GVL reactiviteit te induceren. Het behandelen van leukemie met behulp van cellen van het immuunsysteem wordt ook wel immunotherapie genoemd. Op DLI gebaseerde immunotherapie kan naast GVL reactiviteit echter ook leiden tot GVHD, doordat er een populatie T cellen wordt gegeven waarin ook T cellen kunnen zitten die gezonde weefsels van de patiënt herkennen. Om GVHD en GVL helemaal van elkaar te kunnen scheiden moeten er T cellen geïsoleerd worden die of alleen leukemiecellen of alleen cellen van het hematopoietische systeem van de patiënt herkennen.

De T cel receptor

T cellen kunnen lichaamsvreemde, virusgeïnfecteerde of tumorcellen herkennen met behulp van een T cel receptor (TCR) die op het celoppervlak van de T cel bevindt. De TCR is opgebouwd uit een TCR α keten en een TCR β keten. De TCR stelt een T cel in staat tot het herkennen van kleine fragmenten van eiwitten, peptiden genoemd, die gepresenteerd worden op het oppervlak van bijna elke lichaamscel in speciale presentatie moleculen: de HLA moleculen. De peptiden die herkend kunnen worden door T cellen worden ook wel epitopen of antigenen genoemd. Elke TCR is in principe specifiek voor één epitoot in de context van een HLA molecuul. Het grote aantal T cellen met verschillende specificiteiten zorgt voor immuniteit tegen grote aantallen verschillende antigenen.

Wanneer we kijken naar de functionaliteit van T cellen, dan kan er grofweg onderscheid worden gemaakt in cytotoxische T cellen en helper T cellen. Cytotoxische T cellen zijn in staat om cellen die ze herkennen direct te vernietigen door ze te lyseren (cytolytische of cytotoxische activiteit). Cytotoxische cellen herkennen antigenen in HLA klasse I moleculen en expresseren op hun oppervlak naast de TCR een CD8 coreceptor welke de binding met het HLA klasse I molecuul versterkt. Helper T cellen maken met name immuunmodulerende stoffen, cytokines genoemd, die de cytotoxische T cellen stimuleren en daarnaast ook van invloed zijn op andere cellen van het immuunsysteem. Helper T cellen herkennen antigenen in de context van HLA klasse II en hebben daarvoor een andere coreceptor, de CD4 coreceptor.

De peptiden die op het oppervlak van bijna elke lichaamscel worden gepresenteerd aan de T cellen in de HLA klasse I moleculen zijn afkomstig van afgebroken, vaak gerecyclede, eiwitten uit de betreffende cel. HLA klasse II moleculen komen vooral voor op cellen van het hematopoietische systeem. HLA klasse II moleculen presenteren ook epitopen afkomstig van eiwitten van binnen de cel, maar daarnaast ook van extracellulaire eiwitten. In ons lichaam circuleren normaal gesproken geen T cellen die normale, lichaamseigen eiwitfragmenten herkennen. Indien een T cel met zijn TCR een antigeen herkent is dit meestal afkomstig van een lichaamsvreemd eiwit, een virus of een eiwit dat abnormaal gevormd wordt in een tumorcel.

Dit proefschrift

Immunotherapie gebaseerd op T cellen is een aantrekkelijke strategie voor de behandeling van leukemie. Voor de toepassing ervan moeten er voldoende aantallen T cellen worden geïsoleerd die in staat zijn antigeen specifieke reactiviteit tegen de leukemiecellen te induceren, zonder GVHD, te veroorzaken. Helaas is de tijd om voldoende therapeutische T cellen te genereren meestal beperkt en het kweken in het laboratorium (*in vitro* kweken) kost veel tijd en is bewerkelijk. Daarnaast leveren de *in vitro* kweken niet altijd T cellen op met de gewenste eigenschappen. Een snellere en minder arbeidsintensieve methode om grote aantallen T cellen voor immunotherapie te genereren, is het genetisch overzetten van leukemie herkende TCRs op grote aantallen T cellen van de SCT donor. Dit introduceren van genen in andere cellen met behulp van een retrovirus wordt retrovirale gen transductie genoemd. Het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, was gericht op de karakterisatie van T cel populaties die zouden kunnen dienen als gastheercellen voor de therapeutische TCRs en daarnaast op het bepalen van de mogelijkheden en beperkingen van deze cellen als immunotherapeutische cellen voor de behandeling van leukemie.

Gen overdracht van een HLA klasse II gerestricteerde TCR genereert CD4⁺ T cellen met helper activiteit en cytotoxische capaciteit

CD8⁺ T cellen worden beschouwd als de cytotoxische T cellen die beter in staat zijn om cellen die ze herkennen te vernietigen dan CD4⁺ T cellen. Echter, voor immunotherapie van leukemie kan de toepassing van een CD4⁺ T cel een aantal voordelen hebben ten opzichte van CD8⁺ T cellen. CD4⁺ T cellen kunnen antigenen in HLA klasse II moleculen herkennen, welke vooral tot expressie komen op hematopoïetische cellen. Andere cellen in het lichaam brengen HLA klasse II moleculen alleen tot expressie bij ontstekingsreacties. Doordat de expressie van HLA klasse II moleculen, bij afwezigheid van ontstekingsreacties, alleen voor komt op hematopoïetische cellen kan HLA klasse II gerestricteerde immuunreactiviteit GVL induceren zonder GVHD. Daarnaast heeft de toepassing van CD4⁺ T cellen als voordeel dat ze cytotoxiciteit kunnen combineren met de productie van grote hoeveelheden cytokines. **Hoofdstuk 2** beschrijft de retrovirale gen overdracht van een HLA klasse II gerestricteerde TCR naar CD4⁺ en CD8⁺ T cellen om HLA klasse II gerestricteerde cellen te verkrijgen die in staat zijn tot zowel cytotoxische activiteit als cytokine productie. De CD4⁺ T cellen die werden verkregen vertoonden antigeen specifieke cytolytische activiteit en waren in staat grote hoeveelheden cytokines te produceren, verder waren deze cellen in staat tot celdeling (proliferatie) na antigeen specifieke stimulatie. The cytolytische activiteit en proliferatie van de TCR-getransduceerde CD8⁺ T cellen en CD4⁺ T cellen was vergelijkbaar, maar de CD4⁺ T cellen produceerden meer cytokines na antigeen specifieke stimulatie. Gen overdracht van de CD4 coreceptor naar de TCR-getransduceerde CD8⁺ T cellen stelde deze cellen niet in staat meer cytokines te produceren dan de TCR-getransduceerde CD4⁺ T cellen. Concluderend, retrovirale gen overdracht van TCRs specifiek voor therapeutische HLA klasse II gerestricteerde antigenen naar CD4⁺ T cellen kan T cellen genereren die antigeen specifieke cytolytische activiteit combineren met cytokine productie. De HLA klasse II

restrictie van de therapeutische T cellen zou, in afwezigheid van ontstekingsreacties, anti-leukemie reactiviteit kunnen induceren zonder GVHD.

$\alpha\beta$ TCR gemodificeerde $\gamma\delta$ T cellen mediëren effectieve anti-leukemie reactiviteit

In **hoofdstuk 3** beschrijven we de retrovirale gen overdracht van $\alpha\beta$ TCRs naar $\gamma\delta$ T cellen in plaats van $\alpha\beta$ T cellen. Het introduceren van extra TCR ketens in $\alpha\beta$ T cellen door middel van gen overdracht kan ertoe leiden dat de oorspronkelijke TCR ketens gaan paren met de nieuw geïntroduceerde TCR ketens. De specificiteit van deze gemixte TCR dimeren is niet te voorspellen en ze zijn mogelijk autoreactief. $\alpha\beta$ TCR gen overdracht naar $\gamma\delta$ T cellen voorkomt gemixte dimeer vorming, omdat de TCR α en TCR β niet kunnen dimeriseren met TCR γ en TCR δ ketens. Om te onderzoeken of $\alpha\beta$ TCR getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen geschikt kunnen zijn als immunotherapeutische cellen werd de volgende *in vitro* studie uitgevoerd. Uit het perifere bloed gezuiverde $\gamma\delta$ T cellen werden retroviraal getransduceerd met verschillende klasse I geresliceerde TCRs en de hiervoor beschreven klasse II geresliceerde TCR. Omdat de meeste $\gamma\delta$ T cellen geen coreceptoren tot expressie brengen werd tevens de bijdrage van de coreceptor op de functionele activiteit onderzocht door de coreceptoren CD4 en CD8 ook in te brengen. De $\gamma\delta$ T cellen die gemodificeerd werden met $\alpha\beta$ TCRs en de relevante coreceptoren waren in staat tot antigeen specifieke cytolytische activiteit en produceerden grote hoeveelheden cytokines na antigeen specifieke stimulatie. Daarnaast bleken de $\alpha\beta$ TCR getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen in staat tot het vernietigen van leukemiecellen in een *in vitro* test. Conclusie, $\alpha\beta$ TCR gen overdracht naar $\gamma\delta$ T cellen kan antigeen specifieke T cellen genereren voor immunotherapie van leukemie, zonder dat de cellen gemixte TCR dimeren tot expressie brengen.

$\alpha\beta$ TCR overdracht naar $\gamma\delta$ T cellen genereert functionele effector cellen zonder gemixte TCR dimeren *in vivo*

De $\alpha\beta$ TCR getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen werden ook bestudeerd met behulp van een muizen model om de *in vivo* capaciteit van deze cellen te kunnen bepalen. Dit onderzoek is beschreven in **hoofdstuk 4**. Voor een succesvolle klinische toepassing moeten $\alpha\beta$ TCR getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen kunnen prolifereren *in vivo*, moeten ze antigeen specifieke activiteit vertonen, overleven en opnieuw geactiveerd kunnen worden na een lange periode zonder stimulatie. Om te onderzoeken of $\alpha\beta$ TCR en coreceptor getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen hiertoe in staat zijn werd een *in vivo* studie verricht in een muizen model. De $\alpha\beta$ TCR en coreceptor getransduceerde $\gamma\delta$ T cellen prolifererden *in vivo* op een antigeen specifieke manier, konden overleven en hadden de capaciteit om opnieuw geactiveerd te kunnen worden na een lange periode zonder stimulatie. De gemodificeerde $\gamma\delta$ T cellen verbleven vooral in het perifere bloed en milt, terwijl lage aantallen werden teruggevonden in het darmepitheel waar bepaalde vormen van $\gamma\delta$ T cellen gewoonlijk het meest voorkomen. Functionele analyses toonden aan dat de $\gamma\delta$ T cellen getransduceerd met $\alpha\beta$ TCR en CD8 antigeen specifiek cytokines konden produceren en dat ze in staat waren tot cytotoxische activiteit *in vivo*. Deze data tonen aan dat $\gamma\delta$ T cellen getransduceerd met $\alpha\beta$ TCR en CD8 volledig functioneel zijn *in vivo*. Omdat deze cellen geen gemixte TCR

dimeren tot expressie brengen kunnen ze een veilig alternatief vormen voor TCR getransduceerde $\alpha\beta$ T cellen in klinische toepassingen.

Functionele analyse van cytomegalovirus specifieke CD8⁺ T cellen die Killer Ig-like receptoren tot expressie brengen

Hoofdstuk 5 beschrijft de toepassing van TCR gen overdracht als methode om T cel populaties, waarvan nog niet bekend is wat ze herkennen, toch functioneel te kunnen karakteriseren. Omdat de T cellen die geselecteerd worden als gastheercel voor TCR gen overdracht voor een groot deel de functionele eigenschappen van de gegenereerde TCR gemodificeerde T cellen bepalen is functionele analyse van verschillende kandidaat gastheercel populaties wenselijk. Daarnaast kan meer inzicht in de eigenschappen van andere T cel populaties die mogelijk de activiteit van de TCR gemodificeerde T cellen *in vivo* kunnen beïnvloeden richting geven aan het toekomstig ontwerp van TCR gen therapie strategieën. Omdat T cellen specifiek voor het cytomegalovirus (CMV) een aantal voordelen hebben om te dienen als gastheercel voor TCR gen overdracht, werden CMV specifieke T cellen onderzocht die een zogenaamde inhiberende (remmende) killer Ig-like receptors (KIR) op hun cel oppervlak hebben. KIR komen voor op het oppervlak van NK cellen en sommige T cellen en kunnen de reactiviteit van deze cellen remmen. Op ~10% van de T cellen komt een inhiberende KIR voor en de KIR kan stimulerende signalen die deze T cellen ontvangen via de TCR remmen of zelfs volledig blokkeren. Inhiberende KIR kunnen cytotoxie en cytokine productie van T cellen remmen. Dit zou dus mogelijk ook implicaties kunnen hebben voor TCR gemodificeerde CMV specifieke cellen. Het effect van KIR ligatie op proliferatie is onduidelijk. Er is beschreven dat KIR⁺ T cellen een algemeen proliferatie defect hebben. KIR⁺ CMV specifieke T cellen werden onderzocht in allogene SCT patiënten en gezonde donoren. Na SCT en reactivatie van CMV werden KIR⁺ CMV specifieke T cellen gevonden in patiënten. In slechts 2 van de 6 gezonde donoren konden echter KIR⁺ CMV specifieke T cellen worden aangetoond. Functionele analyse liet zien, dat KIR⁺ CMV specifieke T cellen die geïsoleerd werden van 2 patiënten en een gezonde donor in staat zijn tot cytotoxie, cytokine productie en proliferatie in afwezigheid van KIR stimulatie. Stimulatie van de KIR leidde tot inhibitie van zowel cytotoxie en cytokine productie als proliferatie. De inhibitie bleek afhankelijk van de sterkte van de stimulatie die gelijktijdig werd gegeven op de TCR. Om de functionaliteit van KIR⁺ T cellen die iets anders herkennen dan CMV te vergelijken met de functionaliteit van de KIR⁺ CMV specifieke T cellen werd TCR gen overdracht toegepast. Door TCR gen overdracht te gebruiken konden T cellen waarvan niet kon worden bepaald wat ze herkenden toch functioneel worden onderzocht. KIR⁺ T cellen werden geïsoleerd en vervolgens getransduceerd met een CMV specifieke TCR. De op deze wijze gegenereerde CMV specifieke T cellen lieten in afwezigheid van KIR stimulatie cytotoxie, cytokine productie en proliferatie zien. Wanneer naast de geïntroduceerde CMV specifieke TCR ook de KIR werd gestimuleerd werden zowel cytotoxie en cytokine productie als proliferatie geremd. Conclusie, het lage percentage KIR expressie op CMV specifieke T cellen en de observatie dat sterke TCR stimulatie KIR inhibitie te niet kan doen ondersteunen de selectie van CMV specifieke T cellen als gastheercellen voor gen overdracht van therapeutische TCRs voor de behandeling van leukemie.

Conclusie

De selectie van T cel populaties met andere eigenschappen dan de conventioneel toegepaste CD8⁺ T cellen als gastheercellen voor TCR gen overdracht kan een oplossing zijn voor de beperkingen en problemen van huidige TCR gen overdracht strategieën. Een van de beperkingen is het relatief kleine aantal hematopoietische minor antigenen dat gebruikt kan worden als target antigen voor de behandeling van leukemie. Een nieuwe strategie kan de toepassing van TCR gemodificeerde CD4⁺ T cellen zijn die HLA klasse II moleculen herkennen. Deze laatste moleculen komen met name tot expressie op het oppervlak van hematopoietische cellen. Verder is recentelijk aangetoond dat TCR gen overdracht kan leiden tot autoreactiviteit, doordat er gemixte dimeren worden gevormd tussen de TCR ketens van de gastheercel en de nieuw geïntroduceerde TCR. TCR gen overdracht naar $\gamma\delta$ T cellen in plaats van naar $\alpha\beta$ T cellen kan dit probleem voorkomen. Verder is meer kennis over verschillende T cel populaties die zouden kunnen dienen als gastheercel of die een manipulerend effect kunnen hebben op TCR gen gemodificeerde T cellen nodig voor verdere verbetering van TCR gen therapie. De toepassing van TCR gen overdracht als strategie om T cellen met onbekende specificiteit toch functioneel te kunnen onderzoeken kan hieraan bijdragen. Dus een frisse blik op verschillende typen T cellen kan bijdragen aan een verdere verbetering van TCR gen therapie voor de behandeling van leukemie. Met hooggespannen verwachtingen kan er worden uitgekeken naar de resultaten van de analyse van TCR gen therapie in toekomstige klinische studies.

