



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Adoptive transfer of tumor- and minor antigen-specific T cell reactivity in mouse models

Witte, M.A. de

Citation

Witte, M. A. de. (2008, May 29). *Adoptive transfer of tumor- and minor antigen-specific T cell reactivity in mouse models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12870>

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/1887/12870>

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

Summary

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Summary

In **chapter 1** a general introduction on tumor immunotherapy is given, with special emphasis on T cell-based passive immunization. Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in combination with donor lymphocyte infusion (DLI) has proven to be very successful in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Infused lymphocytes can target mismatched minor histocompatibility antigens (MiHAg) expressed on tumor cells, therefore contributing to the Graft-versus-Leukemia effect (GvL). Unfortunately, DLIs can also recognize mismatched MiHAg expressed on healthy tissue, which may result in the serious complication Graft-versus-Host Disease (GvHD). Since the magnitude of the GvL reaction often coincides with the severity of GvHD, separation of these two effects is one of the important challenges within this field.

In **chapter 2** we use a well-characterized experimental hematopoietic stem cell transplantation model (B6→BALB.B) to test whether removal of potentially harmful T cells can alter the development of GvHD. We demonstrate that immunodominant H60- and H4-specific CD8⁺ T cell responses can be effectively suppressed through MHC class I tetramer-mediated purging of the naïve CD8⁺ T cell repertoire, but that the development of GvHD occurs unimpeded upon suppression of the immunodominant MiHAg-specific T cell response. These data indicate that antigen-specific graft engineering is feasible, but that immunodominance does not necessarily predict an essential role in GvHD development.

When tumors (such as melanoma) express tumor associated antigens (TAAs) which are not differentially expressed between two individuals, alternative sources of tumor specific T cells may need to be sought. Transfer of genes encoding a TAA specific TCR into patient-derived T cells (a process further referred to as TCR gene transfer) has been proposed as an attractive alternative for those patients for whom allo-SCT/DLI is impractical. In **chapter 3** we review the prospects and limitations of TCR gene transfer, as based on *in vitro* experiments and mouse model systems. Furthermore, we discuss the potential clinical application of this gene therapy approach, and the possible barriers on the route towards clinical use.

In the subsequent chapters murine models are utilized to address several issues regarding the *in vivo* behavior of TCR modified T cells, which may be of importance in translating this novel technique into clinical trials. Because most TAAs are non-mutated self-antigens, we studied in **chapters 4** and **5** whether TCR gene modified T cells can target tissue and tumors expressing self-antigens. Hereto we used a model for autoimmune diabetes (RIP-OVA) and a spontaneous prostate tumor model (TRAMP), in which in both cases the endogenous T cell repertoire is non-responsive towards active vaccination. However, infused T cells transduced with an exogenous TCR specific for the relevant self-antigen can proliferate upon vaccination in these tolerant mice. Upon vaccination, TCR

transduced T cells can target both tissue and tumors expressing the same self-antigens, resulting in the induction of severe diabetes and a temporary suppression of transplanted B16-OVA tumors in the RIP-OVA model and a halt in tumor development in the TRAMP model. These data demonstrate the feasibility of utilizing a collection of ‘off the shelf’ T cell receptor genes to target defined tumor-associated self antigens and thereby form a clear incentive to test this immunotherapeutic approach in a clinical setting.

In **chapter 6** we studied in the RIP-OVA/B16-OVA model which clinically feasible strategies determine the *in vivo* effectiveness of TCR modified T cells. The experiments of this chapter reveal three factors that contribute greatly to *in vivo* potency of TCR modified T cells. First, irradiation-induced host conditioning is superior to vaccine-induced activation of genetically modified T cells. Second, increasing TCR expression through genetic optimization of TCR sequences has a profound effect on *in vivo* anti-tumor activity. Third, a high precursor frequency of TCR modified T cells within the graft is essential. The strategies outlined here should be of value to enhance the anti-tumor activity of TCR-modified T cells in clinical trials.

Whereas the studies presented in this thesis primarily focus on the efficiency of TCR gene transfer, experiments addressing the safety of this form of cellular therapy remain largely to be done. As discussed in **chapter 4** and **chapter 8**, autoreactivity towards healthy tissue of TCR modified T cells is a conceivable side effect. In case murine or clinical studies will learn that TCR transduced T cells can induce severe toxicity, incorporation of a conditional safety switch may be a valuable safety measure. In **chapter 7** we tested in the RIP-OVA model an inducible caspase 9 based safety switch, which is developed to control the survival of adoptively transferred cell populations. Self-reactive T cells expressing this conditional safety switch exerted unimpaired effector function *in vivo* but could be specifically and rapidly eliminated upon triggering, resulting in the reversion of an otherwise fatal attack of the pancreas.

The general discussion in **chapter 8** focuses on the efficacy and safety of both allo-SCT/DLI and TCR gene transfer based T cell immunotherapies. Data obtained in animal models here and by others are summarized and discussed, and directions for future (pre-)clinical studies are suggested.

Nederlandse Samenvatting¹

‘Wat doe je precies’ en ‘levert het iets op’ zijn de meest gestelde vragen wanneer vanuit mijn omgeving geïnformeerd wordt naar de vorderingen van mijn promotieonderzoek. Heel kort samengevat komt het erop neer dat ik heb geprobeerd om T cellen (één van de celtypen van het afweersysteem) met behulp van genterapie kankercellen op te laten ruimen (hoofdstuk 3).

Het afweersysteem, ook wel het immuunsysteem genoemd, is een grote familie van cellen die vreemde, ziekmakende indringers zoals virussen en bacteriën (pathogenen) onschadelijk maakt. In het vernietigen van kankercellen is het immuunsysteem echter veel minder succesvol. In het eerste deel van deze samenvatting bespreek ik waarom T cellen wel in staat zijn pathogenen te herkennen, maar kankercellen meestal negeren. In het tweede deel bespreek ik hoe genterapie een mogelijke oplossing kan bieden en welke vorderingen er tijdens mijn promotieonderzoek zijn gemaakt.

T cellen zijn specialisten in het herkennen en opruimen van met virus geïnfecteerde cellen. Hoe gebeurt dat? Het helpt om een heel simplistische voorstelling te maken van een T cel. Een T cel bestaat uit een zakje water met daarin een kern met DNA en een machinerie om bij te kunnen dragen aan de verdelging van virussen. De T cel is omgeven door een membraan vol met eiwitten waarmee de cel communiceert met de buitenwereld. Eén van die eiwitten is de T cel receptor (TCR). Hiermee herkent een T cel een vreemde indringer. Iedere T cel heeft één unieke TCR (weliswaar in vele kopieën) en kan daarmee ‘maximaal’ één bepaald soort virus herkennen. Omdat elke T cel een andere TCR heeft en ieder mens over miljoenen T cellen beschikt, is er bij gezonde mensen gelukkig altijd wel een geschikte T cel aanwezig voor de herkenning van een virus.

Alvorens een T cel een pathogeen herkent, moet dit in zeer kleine stukjes gehakt worden en op een presenteerblaadje worden opgediend. Dit proces vindt in cellen plaats. Virussen nestelen zich van nature in een cel, andere pathogenen (onder meer de meeste bacteriën) worden alleen door gespecialiseerde cellen opgenomen. De presenteerblaadjes worden gevormd door de MHC (Major Histocompatibility Complex) moleculen, die in grote aantallen op de membraan van bijna iedere lichaamscel te vinden zijn. Elk MHC molecuul bevat een verschillend stukje eiwit (peptide). Dit kan afkomstig zijn van een in stukjes gehakt pathogeen, maar is nog veel vaker een restje eiwit van de cel zelf. In wezen kan de verzameling peptiden op de gezamenlijke MHC moleculen van een cel beschouwd kunnen worden als een weerspiegeling van wat zich in een cel afspeelt. Wanneer een T cel een bepaalde MHC-peptide combinatie tegenkomt die past op zijn TCR, dan is dit een teken dat de cel een pathogeen bevat. De T cel zal alles in het werk zetten om ervoor te zorgen dat het pathogeen zich

¹ Deze Nederlandse samenvatting is eigenlijk meer een 'lekenpraatje' dan een samenvatting. Ik ga ervan uit dat eenieder die een Nederlandse samenvatting in de letterlijke zin van het woord zou kunnen begrijpen, zich ook kan redden met de Engelse versie. Met deze samenvatting beoog ik mensen die geen biomedische achtergrond hebben te betrekken bij mijn proefschrift. Daarbij ontikom ik er niet aan bepaalde zaken af en toe wat zwart-wit voor te stellen en ik realiseer me ook niet volledig te zijn. Ik hoop echter wel de essentie van passieve T cel therapie overgebracht te hebben.

niet verder kan verspreiden. Vaak sneuvelt daarbij de geïnfecteerde cel, uiteraard met als doel de rest van het lichaam voor een vijandelijke overname door indringers te behoeden. Hoe kunnen de T cellen eigenlijk ‘weten’ met welke virussen en bacteriën allemaal rekening gehouden moet worden? Het zijn er onvoorstelbaar veel en ze veranderen voortdurend. Dit weten T cellen helemaal niet. T cellen handelen volgens een rechtlijnig principe: Elimineer alles wat niet-eigen is. T-cellen hebben er dus geen weet van hoe een virus of bacterie er precies uit ziet, maar hebben wel ooit geleerd wat lichaamseigen is.

De T cel ontwikkeling vindt plaats in een speciaal daarvoor gereserveerd orgaan, de thymus. Iedere T cel heeft zoals gezegd een unieke TCR en alle T cellen samen vormen een zeer groot en divers leger. De blauwdruk (of gen) voor elk eiwit (en dus ook voor een TCR) ligt in het DNA, het erfelijk materiaal in de celkern. Het stuk DNA waar de TCR genen zich bevinden zit heel ingenieus in elkaar. Met relatief weinig ruimte en wat ‘knippen en plakken’ kunnen hierdoor vele² unieke TCR eiwitten gemaakt worden. Het samenstellen van een TCR eiwit geschiedt willekeurig en het is vooraf niet bekend of de TCR een stukje virus of bacterie herkent, of een stukje van één van de lichaamseigen eiwitten. T cellen met een TCR behorende tot deze laatste categorie moeten uiteraard niet gaan rondzwerven in het lichaam, omdat daarmee het risico gelopen wordt dat gezonde cellen worden aangevallen. Om dit te voorkomen, passeren alle ontwikkelende T cellen een speciale groep cellen in de thymus (de mTECs). Deze presenteren op hun MHC moleculen een zeer uitgebreid scala van lichaamseigen eiwitfragmenten. Wanneer een zich ontwikkelende T cel een TCR heeft die toevallig heel goed kan binden aan één van deze lichaamseigen eiwitten, dan wordt deze T cel acuut geëlimineerd. Alle T cellen die de thymus verlaten hebben deze selectieprocedure ondergaan. Hierdoor zijn er dus geen T cellen in de rest van het lichaam die een TCR hebben die kan binden aan MHC moleculen met lichaamseigen eiwitten. Wanneer een T cel een passende peptide-MHC combinatie buiten de thymus tegenkomt, moet het dus wel van vreemde origine zijn en is eliminatie gewenst³.

T cellen zijn er dus voor gemaakt om cellen met vreemde elementen te herkennen. Herkennen ze dan ook kankercellen? Helaas is dat vaak niet het geval. Een kankercel ontstaat uit een gezonde lichaamscel die gedurende het leven een aantal veranderingen (mutaties) heeft ondergaan. Als gevolg hiervan kunnen deze cellen zich ongelimiteerd delen (zo ontstaat een gezwel, ook wel tumor genoemd) en zich nestelen op plekken waar dat helemaal niet de bedoeling is (uitzaaien). Deze veranderingen zijn heel subtiel. Het kan bijvoorbeeld zijn dat een eiwit dat de normale celgroei controleert niet meer functioneert. Of het kan zijn dat een eiwit dat de celdeling bevordert juist in versterkte mate aanwezig is. Een kankercel heeft hierdoor andere eigenschappen gekregen, maar de

² In muizen is geschat dat er in theorie 10^{15} verschillende mogelijke TCR eiwitten samengesteld zouden kunnen worden. *Davis et al, Nature 334;395-402 (1988)*

³ Tijdens de evolutie is kennelijk geen rekening gehouden met transplantatie geneeskunde. Een nier van donor A verschilt vaak aanzienlijk van een nier in patiënt B. De T cellen van patiënt B zien de donornier als een collectie van vreemde cellen en trachten daarom de nier af te stoten. Maar dit terzijde.

samenstelling van de eiwitten is (meestal) niet veranderd. Op de MHC moleculen aan de buitenkant van de kankercel bevinden zich daarom alleen fragmenten van lichaamseigen eiwitten. Het is om deze reden dat T cellen een kankercel ook niet als ziek en gevaarlijk beschouwen, maar als 'eigen'. Dat is jammer, want T cellen zouden uitermate geschikt kunnen zijn om zieke kankercellen op te ruimen.

In feite zou een kankercel namelijk best herkend en aangevallen kunnen worden. Iedere cel heeft immers MHC moleculen, dus de dienblaadjes met peptiden zijn aanwezig⁴. Maar helaas zijn er geen passende T cellen of preciezer gezegd, helaas zijn er geen passende TCRs. De oplossing lijkt voor de hand te liggen, geef TCRs die kankercellen kunnen herkennen. Dit kan inmiddels ook met antistoffen, die tegenwoordig aan mensen met bijvoorbeeld borstkanker gegeven worden. Echter, omdat de TCR gekoppeld is aan het T cel oppervlak moeten deze TCRs wel 'in de T cel gebracht worden'. Gentherapie zou hiertoe een oplossing kunnen zijn⁵, hoe stellen wij ons dat voor?

Stel je neemt T cellen van een patiënt en transfereert er een nieuw 'tumor-specifieke TCR' gen in. Wanneer dit gen wordt afgelezen, wordt de nieuwe 'tumor-specifieke TCR' gemaakt die door de T cel naar het celoppervlak gebracht kan worden. Deze genetisch gemodificeerde T cellen zouden vervolgens terug gegeven kunnen worden aan de patiënt. Wanneer deze T cellen opnieuw de tumor tegenkomen, kan de nieuwe TCR nu hopelijk wel aan peptide-MHC op de tumor binden en zullen de T cellen proberen de kankercellen te elimineren (hoofdstuk 3). Bovenstaande hypothese heb ik de afgelopen jaren bestudeerd in muizenmodellen. De resultaten lijken veelbelovend! Eén van de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift is dat in situaties waar het afweersysteem van de muis niet in staat is een tumor te herkennen, TCR gen transfer ervoor kan zorgen dat T cellen dit wel kunnen (hoofdstuk 4 en 5). Deze resultaten nodigen uit om de hypothese tevens te testen in patiënten, maar daarvoor moeten we meer weten.

Allereerst is het belangrijk te weten hoe de genetisch gemodificeerde T cellen zo goed mogelijk hun werk kunnen doen. Je zou er bijvoorbeeld voor moeten zorgen dat ze heel goed kunnen delen na infusie in de patiënt, zodat er een groot leger van tumor-specifieke T cellen beschikbaar komt. Of je zou ervoor kunnen zorgen dat er van een getransfereerd gen heel efficiënt eiwit wordt gemaakt, zodat er veel TCRs op het celoppervlak komen. Dit soort strategieën hebben we in vervolgstudies getest. Hierin is een aantal klinisch toepasbare technieken gevonden, die de functie van genetisch gemodificeerde T cellen ten gunste lijkt te beïnvloeden (hoofdstuk 6). Daarnaast is het ook heel belangrijk dat de behandeling geen ernstige bijwerkingen veroorzaakt. Men zou zich kunnen voorstellen dat wanneer T cellen worden 'heropgevoed' om 'eigen eiwitten' op kankercellen te gaan herkennen, er wellicht ook een risico bestaat dat ze lichaamseigen eiwitten op gezonde weefsels zullen

⁴ In praktijk blijkt dat tumorcellen allerlei listen verzinnen om het afweersysteem om de tuin te leiden. Eén van die listen is het aantal MHC moleculen op de membraan verlagen. Dit 'iedere' moet je dus vooral niet te letterlijk nemen.

⁵ Voorwaarde is de aanwezigheid van een gen dat codeert voor een tumor specifieke TCR. Deze zijn voor muizen relatief eenvoudig te verkrijgen, maar voor mensen niet. Het ontwikkelen van technieken om deze ook voor mensen te verkrijgen, verdient daarom ook grote prioriteit.

herkennen en beschadigen. In andere varianten van T cel kankertherapie komt dit regelmatig voor (hoofdstuk 2). Momenteel zijn onderzoekers druk bezig deze risico's in kaart te brengen (hoofdstuk 8). Mocht de kans op bijwerkingen aanzienlijk blijken te zijn, dan is het wellicht nuttig genetisch veranderde T cellen van een noodrem te voorzien (hoofdstuk 7).

Experimenten gedaan in proefdieren (zowel op het NKI als in andere laboratoria) hebben er toe bijgedragen dat de eerste patiënten inmiddels behandeld zijn. Onderzoekers van het National Institutes of Health (NIH) in de Verenigde Staten hebben geconstateerd dat genetisch gemodificeerde T cellen kunnen overleven in de patiënt en dat ze in enkele gevallen ook de groei van kankercellen lijken te remmen. Het betrof hier patiënten met huidkanker in een ver gevorderd stadium. Toekomstige klinische trials (mede op het Nederlands Kanker Instituut) zullen moeten gaan uitwijzen of en op welke schaal TCR gen transfer een significante bijdrage kan leveren aan de behandeling van patiënten met kanker.

Curriculum Vitae

Moniek Angenies de Witte werd geboren op 12 januari 1976 te Nijmegen. Op de Nijmeegse Scholengemeenschap Groenewoud behaalde zij in 1994 het gymnasium diploma. In 1993 heeft zij deelgenomen aan een 'summer research program' van het Roswell Park Cancer Institute in Buffalo, USA. In 1994 werd begonnen met de studie Medische Biologie aan de Universiteit van Amsterdam, waar zij in 2001 het doctoraal examen behaalde. In 1995 mocht zij starten met de studie Geneeskunde aan dezelfde universiteit, waaraan tevens in 2001 het doctoraal behaald werd. Dit werd in 2002 gevolgd door het artsexamen, met als aantekening *cum laude*. In het kader van beide studies werden 2 stages gelopen. Het eerste onderzoek werd gedaan in 'The National Institute of Health' in Bethesda, USA, in het lab van Dr. John Tisdale. Het tweede stageonderzoek werd verricht binnen de vakgroep Medische Microbiologie van het AMC, onder begeleiding van Dr. Yvonne Pannekoek. Van januari 2003 tot en met oktober 2007 heeft zij gewerkt als onderzoeker in opleiding (OIO) in de onderzoeksgroep van Professor Ton Schumacher, op de afdeling Immunologie van het Nederlands Kanker Instituut. Tijdens dit onderzoek werd deelgenomen aan verscheidene (internationale) congressen, waar zij in 2005 de 'Poster Prize' won op de jaarlijkse bijeenkomst van de European Network of Immunology Institutes en in 2006 de Luminex Award voor 'Best Lecture Clinical Science' tijdens de jaarlijkse retraite van promotiestudenten verbonden aan de Onderzoeksschool Oncologie Amsterdam. Daarnaast werd zij in deze tijd moeder van een dochter 'Eefje'. In oktober 2007 is zij begonnen met de opleiding tot internist binnen het AMC. Momenteel is zij werkzaam als arts-assistent in het Flevoziekenhuis te Almere.

List of Publications

De Witte MA, Jorritsma A, Van den Boom M, Dokter M, Haanen JABG, Schumacher TNM. Requirements for effective anti-tumor responses of TCR transduced T cells. *Submitted for publication*

De Witte MA, Bendle G, Van den Boom MD, Coccoris M, Schell TD, Tevethia SS, Van Tinteren H, Mesman EM, Song JY, Schumacher TNM. Assessing TCR gene therapy and vaccination in spontaneous prostate carcinoma in mice. *Accepted for publication in the Journal of Immunology*

Coccoris M, Swart E, De Witte MA, Van Heijst J, Haanen JBAG, Schepers K, Schumacher TNM. Long-term functionality of TCR transduced T cells *in vivo*. *Journal of Immunology: in press*

De Witte MA, Jorritsma A, Swart E, Straathof KC, De Punder K, Rooney CM, Haanen, JABG, Schumacher TNM. An inducible caspase 9 safety switch can halt cell therapy-induced autoimmune disease. *Journal of Immunology: in press*

Abad JD, Wrzensinski C, Overwijk W, De Witte MA, Jorritsma A, Gattinoni L, Cohen CJ, Paulos CM, Palmer DC, Haanen JBAG, Schumacher TNM, Rosenberg SA, Restifo NP, Morgan RA. T cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model. *J. Immunotherapy 31: 1-6 (2008)*

De Witte MA, Wolkers MC, Toebes M, Song JY, Schumacher TNM. Feasibility of removal of MiHA_g-specific T cell responses and consequences for Graft versus Host Disease. Effective graft depletion of MiHA_g T-cell specificities and consequences for graft-versus-host disease. *Blood 109: 3830-8 (2007)*

De Witte MA, Coccoris M, Wolkers MC, Van den Boom M, Mesman E, Song JY, Van der Valk M, Haanen JABG, Schumacher TNM. Targeting self antigens through allogeneic TCR gene transfer. *Blood 18: 870-7 (2006)*

Coccoris M, De Witte MA, Schumacher TNM. Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy. *Curr Gene Ther. 5: 583-93 (2005)*

Van de Wetering MD, De Witte MA, Kremer LCM, Offringa M, Scholten RPJM, Caron HN. The efficacy of selective decontamination of the digestive tract (SDD) in oncology patients: a systematic review of randomised controlled trials. Efficacy of oral prophylactic antibiotics in neutropenic afebrile oncology patients: a systematic review of randomised controlled trials. *Eur J Cancer 41: 1372-82 (2005)*

De Witte MA, Schumacher TNM. Generating CTL by HLA transplant. *Blood 103: 4381-2 (2004)*

Kang EM, De Witte M, Malech H, Morgan RA, Carter C, Leitman SF, Childs R, Barrett AJ, Little R, Tisdale JF. Gene therapy-based treatment for HIV-positive patients with malignancies. *J Hematother Stem Cell Res. 11: 809-16 (2002)*

Kang EM, De Witte M, Malech H, Morgan RA, Phang S, Carter C, Leitman SF, Childs R, Barrett AJ, Little R, Tisdale JF. Nonmyeloablative conditioning followed by transplantation of genetically modified HLA-matched peripheral blood progenitor cells for hematologic malignancies in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood 99: 698-701 (2002)*

Kang EM, Hanazano Y, Frare P, Vanin EF, De Witte M, Metzger M, Liu JM, Tisdale JF. Persistent low-level engraftment of rhesus peripheral blood progenitor cells transduced with the fanconi anemia C gene after conditioning with low-dose irradiation. *Mol Ther. 3: 911-9 (2001)*

Pannekoek Y, Van der Ende A, Eijk PP, Van Marle J, De Witte MA, Ossewaarde JM, Van den Brule AJ, Morre SA, Dankert J. Normal IncA expression and fusogenicity of inclusions in Chlamydia trachomatis isolates with the incA I47T mutation. *Infect Immun. 69: 4654-6 (2001)*

Kuijper EJ, De Witte M, Verhagen DW, Kolk AH, Van der Meer JT, Dankert J. [Mycobacterium genavense infection in 2 HIV seropositive patients in Amsterdam] *Ned Tijdschr Geneeskd.;142: 970-2 (1998)*





