

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22520> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Linnemann, Carsten

**Title:** Enginee ring T cell immunity by TCR gene transfer

**Issue Date:** 2013-11-27

## | SUMMARY

T cell responses against tumor-antigens are frequently observed for some human malignancies, in particular melanoma. However, the spontaneous development of T cell responses of a sufficient strength to eradicate human malignancies is rare.

The transfer of T cell receptor (TCR)  $\alpha\beta$  genes into autologous T cells, a process called TCR gene transfer, allows one to engineer antigen-specific T cell responses of interest. Over the last decade, TCR gene transfer has progressed to the stage of clinical evaluation as a strategy to engineer T cell responses against tumor-antigens, in order to treat metastatic melanoma and other malignancies.

The scope of the work in this thesis (outlined in **Chapter 1**) is to advance the development of TCR gene transfer as an engineering strategy for T cell immunity against cancer. This involves the assessment of the safety of TCR gene transfer, the evaluation of strategies to optimize the function of TCR-modified T cells *in vivo*, and the development of technologies to identify tumor-reactive TCR $\alpha\beta$  genes. In **Chapter 2**, we review the different aspects of TCR gene transfer in detail, and discuss how the further development of TCR gene transfer should proceed.

### Assessing the safety of TCR gene transfer

In **Chapter 3**, we assess the safety profile of TCR-modified T cells in a preclinical model of TCR gene transfer. Our findings demonstrate the consequences of the formation of TCR $\alpha\beta$  dimers, comprised of an introduced and endogenous TCR chain ('mixed TCR-dimers'), which occurs after transfer of new TCR $\alpha\beta$  genes into T cells. We describe that mixed TCR-dimers can induce a fatal form of Graft-versus-Host-Disease, characterized by bone-marrow failure. Furthermore, we show that engineering strategies that promote preferential pairing of the introduced TCR $\alpha\beta$  chains can greatly reduce the incidence of such TCR gene transfer-induced Graft-versus-Host-Disease.

### Enhancing the anti-tumor reactivity of TCR-modified T cells

In **Chapter 4**, we evaluate the capacity of TCR-modified T cells for the treatment of advanced tumor lesions in a preclinical model of prostate carcinoma. Despite being able to recognize tumor cells, we observe that infusion of TCR-modified T cells fails to fully eradicate such advanced lesions. Subsequently, we reveal that advanced tumors in this model, in marked similarity to many human malignancies, produce Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a known inhibitor of T cell function. By additional genetic engineering, leading to the expression of a dominant-negative TGF- $\beta$  receptor II, we render TCR-modified T cells insensitive to TGF- $\beta$  inhibition and demonstrate that TCR gene transfer with such dual-modified T cells leads to complete, sustained regression of advanced tumor lesions and, as a consequence, enhanced survival.

### Developing technology for the further development of TCR gene transfer

In **Chapter 5**, we extend the UV-mediated peptide exchange Major Histocompatibility Complex (MHC)-multimer technology to a number of different human leukocyte antigen (HLA) class I alleles. We show that this technology can be used to detect antigen-specific T cell responses against large collections of antigens by flow cytometry, a property we exploit in Chapters 5 and 6. In **Chapter 6**, we then present a high-throughput TCR gene

capture approach for the isolation of TCR $\alpha\beta$  genes. This method is based on the capture and sequencing of genomic fragments. The quantitative nature of the resulting next-generation-sequencing data reveals relative frequency of all TCR $\alpha$ - and  $\beta$ -sequences and, because of this, TCR $\alpha\beta$  pairs can be directly determined within oligoclonal T cell populations, by 'frequency-based matching.' We use TCR gene capture to analyze the TCR repertoires of tumor-antigen specific T cell responses and intratumoral T cell populations and demonstrate for the first time the rapid assembly of a large library of TCR $\alpha\beta$  genes for potential clinical use in TCR gene transfer. In **Chapter 7**, we present a complementary strategy to identify TCR $\alpha\beta$  genes directly from single T cells, an approach that holds great promise for more academically oriented studies to, for instance, analyse and reconstruct highly diverse TCR repertoires within different human malignancies or different T cell subsets.

Finally, the future prospects of TCR gene transfer are outlined in **Chapter 8**. Amongst other things, we discuss the possible development of "autologous TCR gene transfer". This concept refers to a highly personalized treatment in which tumor-reactive TCR genes from an individual are identified and used to redirect autologous T cells, thereby offering the possibility to 'transplant' a tumor-reactive TCR repertoire – including TCRs specific for patient-specific antigens – from exhausted cells to a more fit T cell population.

## | NEDERLANDSE SAMENVATTING

T cel responsen tegen tumor antigenen worden met regelmaat gedetecteerd bij patiënten met sommige typen tumoren, met name bij patiënten met kwaadaardige huidkanker (melanoom). Echter, het optreden van een T cel respons die sterk genoeg is om tot tumor regressie te leiden is zeer zeldzaam.

Het inbrengen van de twee genen die coderen voor de T cel receptor (TCR) in T cellen van een patiënt, een proces dat TCR gen transfer wordt genoemd, stelt ons in staat om T cellen die van nature de tumor niet te herkennen in het lab tumor reactief te maken. In de laatste jaren is het concept van TCR gen transfer dermate ver ontwikkeld dat klinische studies uitgevoerd worden, met als doel om T cel responsen tegen tumor-antigenen te induceren bij patiënten met uitgezaaid melanoom en andere tumor typen.

De intentie van dit proefschrift is de verdere ontwikkeling van TCR gen transfer als een strategie om T cel immuniteit tegen kanker te verbeteren. In dit werk is de veiligheid van TCR gen transfer onderzocht, zijn verschillende strategieën om de functie van TCR-gemodificeerde T cellen te optimaliseren geëvalueerd, en hebben we technologieën ontwikkeld om de alpha en beta keten van tumor-reactieve T cel receptor genen op een snelle wijze te kunnen identificeren. **Hoofdstuk 2** bevat een overzichtsartikel waarin deze aspecten in detail besproken worden en waarin we bediscussiëren hoe de verdere ontwikkeling van TCR gen transfer bewerkstelligd kan worden.

### Analyse van de veiligheid van TCR gen transfer

In **Hoofdstuk 3** bepalen we het veiligheidsprofiel van TCR-gemodificeerde T cellen in een preklinisch model voor TCR gen transfer. Onze bevindingen tonen aan dat de transfer van nieuwe alpha en beta ketens in T cellen leidt tot de formatie van dimeren die bestaan uit één geïntroduceerde keten en één endogene (van de T cel zelf) keten (zogenaamde gemengde dimeren) en wat de consequenties hiervan zijn. We tonen aan dat de formatie van deze gemengde dimeren kan leiden tot een fatale vorm van ‘graft-versus-host’ ziekte, gekarakteriseerd door aantasting van het beenmerg. Bovendien tonen we aan dat verdere aanpassingen aan de ingebrachte TCR genen gebruikt kunnen worden om preferentiële vorming van dimeren van de twee geïntroduceerde ketens te bewerkstelligen, om zo het ontstaan van graft-versus-host ziekte tegen te gaan.

### Verhogen van de anti-tumor reactiviteit van TCR-gemodificeerde T cellen

In **Hoofdstuk 4** testen we de functie van TCR-gemodificeerde T cellen voor de behandeling van vergevorderde tumor laesies in een preklinisch model voor prostaat kanker. Ondanks het feit dat de TCR-gemodificeerde T cellen de tumor cellen kunnen herkennen, blijkt dat de TCR-gemodificeerde T cellen niet in staat zijn om deze laesies in voldoende mate op te ruimen. Vervolgens tonen we aan dat de vergevorderde tumoren in dit model – zeer vergelijkbaar met veel humane tumoren – T cel activiteit in het tumor micromilieu kunnen afremmen door de productie van transformerende-groei factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Door een extra modificatie stap kunnen we vervolgens TCR-gemodificeerde T cellen genereren die ongevoelig zijn voor deze TGF- $\beta$  inhibitie en tonen we aan dat TCR gen transfer met deze dubbel-gemodificeerde

T cellen leidt tot een complete en langdurige regressie van vergevorderde tumor laesies en daarmee een verhoogde overleving van de behandelde dieren.

### **Ontwikkeling van technologie voor de identificatie van TCR alpha en beta genen**

In **Hoofdstuk 5** ontwikkelen we UV-gemedieerde peptide uitwisselingstechnologie voor verschillende humane leukocyt antigen (HLA)-allelen en tonen aan dat deze technologie gebruikt kan worden om antigeen-specifieke T cel responsen te detecteren met behulp van flow cytometrie. Deze techniek wordt verder toegepast in zowel Hoofdstuk 5 en 6. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we vervolgens een nieuwe 'high-throughput' technologie ('TCR capture') om snel TCR alpha en beta ketens te isoleren. Deze methode is gebaseerd op de isolatie van genomische fragmenten van het TCR locus, om vervolgens de DNA sequentie te bepalen. Het feit dat deze 'next-generation' sequentie data een kwantitatieve maat geven voor het voorkomen van verschillende TCR sequenties maakt het tevens mogelijk om correcte TCR alpha en beta paren te bepalen in oligoklonale T cel populaties, door middel van 'frequentie-gebaseerde paring'. We gebruiken TCR gen capture om de TCR repertoires van tumor-antigeen specifieke T cellen en intra-tumorale T cel populaties te bepalen en tonen aan dat in zeer korte tijd een collectie van complete TCR alpha/beta genen gemaakt kan worden voor potentieel gebruik in klinische studies van TCR gen transfer.

In **Hoofdstuk 7** presenteren we een aanvullende strategie, waarbij de alpha en beta genen geïdentificeerd worden uitgaande van een enkele cel. Deze aanpak lijkt veelbelovend voor studies in andere humane tumoren of in verschillende T cel compartimenten, waarin bijvoorbeeld zeer diverse TCR repertoires geanalyseerd en gereconstrueerd moeten worden.

De toekomstsmogelijkheden van TCR gen transfer worden tenslotte beschreven in **Hoofdstuk 8**. Hierin wordt het idee van 'autologe TCR gen transfer' besproken. Dit concept behelst een zeer patiënt-specifieke behandeling waarbij autologe tumor-reactieve TCRs van een patiënt gekarakteriseerd worden en vervolgens gebruikt worden voor gen transfer in T cellen van diezelfde patiënt. Met behulp van dergelijke autologe TCR gen transfer zou het mogelijk moeten zijn om het tumor-reactieve TCR repertoire, inclusief TCRs gericht tegen patiënt-specifieke tumor-geassocieerde antigenen, over te brengen in een gezonde T cel populatie. Met name bij tumor typen met een hoog aantal patiënt-specifieke mutaties zou deze aanpak interessant kunnen blijken.