



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploiting HLA-alloreactivity in TCR gene therapy of B cell malignancies

Jahn, L.

Citation

Jahn, L. (2017, April 19). *Exploiting HLA-alloreactivity in TCR gene therapy of B cell malignancies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/48861>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/48861>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/48861> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Jahn, L.

Title: Exploiting HLA-alloreactivity in TCR gene therapy of B cell malignancies

Issue Date: 2017-04-19

Nederlandse Samenvatting

Hematologische maligniteiten met B-cel origine

B-cellen vormen een essentieel onderdeel van het immuunsysteem door antilichamen te produceren die het herkennen en uitroeien van pathogenen mogelijk maken. Antilichamen binden zich aan bepaalde structuren van pathogenen, de zogeheten antigenen. Nadat een antilichaam zich aan een pathogeen gebonden heeft, is deze als lichaamsvreemd gemarkeerd en kan door andere immuuncellen vernietigd worden. Het antilichaam kan los afgescheiden worden in het bloed, maar kan ook in combinatie met andere eiwitten als celmembraan-gebonden complex op de oppervlakte van een B-cel tot expressie komen. Dit complex heet B-celreceptor. Wordt het antigeen door de B-celreceptor gebonden, dan leidt dat tot activatie van de B-cel, wat de verdere ontwikkeling van een B-cel stimuleert maar ook een immuunreactie op gang brengt. Elke B-cel is uniek in de zin dat er kleine verschillen bestaan tussen antilichamen die door de verschillende B-cellen worden aangemaakt. Deze kleine verschillen zijn van belang omdat de aanwezigheid van een grote hoeveelheid aan verschillende B-cellen, ook B-celdiversiteit genoemd, de kans verhoogt dat er op elk moment wel een antilichaam beschikbaar is dat aan de herkenning van een pathogeen kan bijdragen. B-cel diversiteit ontstaat tijdens het uitrijpen van een HSC tot B-cel in het beenmerg en zet zich voort bij de verdere ontwikkeling van de B-cel in de lymfklieren. In elk stadium van de ontwikkeling worden mutaties geïntroduceerd of vindt herschikking van het genetisch materiaal plaats, wat uiteindelijk de eigenschappen van de antilichaam bepaalt. Dit deels stochastische proces leidt uiteindelijk tot een grote B-celdiversiteit. Dit proces is streng gereguleerd en foutieve mutaties of verkeerde genetische herschikking leiden tot een abrupte stop van de celdeling in de betrokken cel, gevolgd door apoptose, een gereguleerde celdood. Niettemin kunnen ongedetecteerde fouten ontstaan die een B-cel tot ongecontroleerde groei in staat stellen; het ontstaan van een hematologische maligniteit met B-cel origine. Bloedkankers met B-cel origine worden gecategoriseerd op basis van het stadium waarin een fout optreedt die tot de kwaadaardige B-celmaligniteit leidt en plek van manifestatie. Leukemie beschrijft kwaadaardige B-cellen die zich in het beenmerg en bloed verspreiden. Van een acute lymfoblastische leukemie (ALL) is sprake als de maligne B-cellen veel overeenkomsten tonen met B-cellen in een vroeg ontwikkelingsstadium. B-cel maligniteiten die voortkomen uit B-cellen die zich in de lymfklieren bevinden worden lymfoom genoemd. Het laatste ontwikkelingsstadium van de B-cel, de zogenoemde plasmacel, kan leiden tot het ontstaan van multipel myeloom.

Therapie van B-celmaligniteiten

De standaard therapie voor B-celmaligniteiten is chemo- en/of radiotherapie. Beide vormen van therapie zijn gericht op de vernietiging van maligne cellen door het toedienen van cytotoxische medicijnen of met behulp van straling. Intensieve chemo- en radiotherapie kunnen tot een remissie leiden, maar zelden is deze volledig en de kans op een recidief,

oftewel terugkomen van de ziekte, is groot. In het afgelopen decennium zijn chemo- en radiotherapie aangevuld met het toedienen van therapeutische antilichamen. Therapeutische antilichamen binden zich aan antigenen op de oppervlakte van maligne cellen. Een cel die op deze manier geopsoniseerd is door antilichamen wordt net als een pathogeen als lichaamsvreemd beschouwd en vervolgens door het immuunsysteem vernietigd. Zo is er bijvoorbeeld het CD20 oppervlakte-eiwit dat zowel op gezonde als ook maligne B-cellen tot expressie wordt gebracht. CD20-specifieke therapeutische antilichamen kunnen bijdragen aan de genezing van patiënten doordat ze zich aan maligne B-cellen binden en zo het immuunsysteem activeren. Dat tijdens het verloop van de therapie ook gezonde B-cellen worden uitgeroeid is een bijwerking die getolereerd wordt; een gebrek aan B-cellen is ongewenst maar niet levensbedreigend en kan behandeld worden door de regelmatige infusie van een antilichamenmengsel afkomstig van gezonde donoren.

Hoewel chemo- en radiotherapie in combinatie met een behandeling met therapeutische antilichamen de kans op genezing sterk heeft vergroot, bestaat er nog een grote groep patiënten bij wie deze therapieën niet aanslaan of waarbij de ziekte na aanvankelijke remissie toch weer terugkomt. Vaak komt de ziekte in een agressievere vorm terug of is deze niet meer met dezelfde therapie te behandelen; er is een resistentie ontstaan. Bovendien zijn therapeutische antilichamen niet voor elk ziektebeeld beschikbaar; acute leukemie of multipel myeloom brengen geen CD20 tot expressie en zijn daarom niet vatbaar voor CD20-specifieke therapeutische antilichaamtherapie.

T-Cellen

T-cellen behoren evenals B-cellen tot de lymfoïde cellen en vormen een belangrijk onderdeel van het immuunsysteem. Vergelijkbaar met een B-cel brengt elke T-cel een unieke T-celreceptor (TCR) tot expressie die specifiek is voor een bepaald antigeen. In tegenstelling tot een antilichaam is de TCR altijd als membraangebonden complex aan de oppervlakte van de T-cel te vinden. Een TCR bestaat uit twee eiwitketens, de TCR α en TCR β ketens, die aan elkaar gekoppeld zijn. Zowel de TCR α als de TCR β keten bevatten willekeurige mutaties en recombinaties in de complement determining regions (CDR3). De CDR3-regio's bepalen welke specifieke structuur (epitoot) door de TCR gebonden kan worden. Een epitoot wordt gevormd door de human leukocyte antigen (HLA) dat aan het celoppervlak korte peptiden presenteert, die afkomstig zijn van door de cel aangemaakte eiwitten. De verzameling van alle peptiden die door een cel kunnen worden gepresenteerd in HLA-moleculen heet dan ook peptidoom of HLA ligandome. Het peptidoom is een belangrijke graadmeter van een cel voor diens status van gezondheid of ziekte. Is er bijvoorbeeld sprake van een virale infectie dan zullen peptiden afkomstig van virale eiwitten in de HLA-moleculen gepresenteerd worden. Een virus-specifieke T-cel zal dan geïnfecteerde cellen kunnen herkennen door de interactie van de TCR met virale peptiden die gepresenteerd worden in HLA-moleculen. Binding van de TCR aan zijn specifieke epitoot leidt tot T-celactivatie; de T-cel ondergaat een korte fase van expansie, er worden cytokines uitgescheiden die aan andere immuuncellen de infectie

door een pathogeen signaleren, en de T-cel scheidt cytotoxische moleculen zoals granzymes, perforines en granzysin uit, die geïnfecteerde cellen aanzetten tot apoptose.

De cytotoxische eigenschappen van de T-cel vereisen een strikte selectie van T-cellen om destructie van gezond weefsel te voorkomen. Zo mogen T-cellen alleen TCRs tot expressie brengen die lichaamsvreemde epitopen herkennen, maar tolerant zijn voor HLA-moleculen die peptiden presenteren van lichaamseigen eiwitten, zogenaamde zelf-peptiden. Deze selectie vindt in de thymus (zwezerik) plaats en gebeurt in twee stappen. Tijdens de positieve selectie worden T-cellen gepropageerd die een TCR tot expressie brengen die een zwakke interactie met HLA-moleculen kunnen aangaan. Dit garandeert dat een verbinding tussen TCR en HLA mogelijk is. Tijdens de negatieve selectie worden T-cellen geëlimineerd met een TCR die een sterke interactie met HLA-moleculen en zelf-peptiden aangaan. Op deze manier wordt een T-celrepertoire gevormd dat de kans biedt lichaamsvreemde pathogenen te herkennen maar tegelijkertijd tolerant tegenover lichaamseigen cellen is. Doordat de genetische verschillen tussen mensen ook in de HLA-moleculen weerspiegeld worden, zijn T-cellen alleen tolerant voor het lichaam waarin de selectie heeft plaatsgevonden. Men spreekt dan ook van autologe (lichaamseigen) en allogene (lichaamsvreemde) HLA moleculen.

T-celreceptor gentherapie

De cytotoxische eigenschappen van T-cellen en de specificiteit voor een bepaald epitoom ligt aan de basis van nieuwe therapieën voor de bestrijding van kanker. Zo tonen klinische studies aan dat T-cellen in staat zijn om selectief maligne cellen te vernietigen. Uit verschillende patiënten zijn tumor-actieve T-cellen geïsoleerd die tumor-specifieke epitopen herkennen. Omdat de specificiteit van T-cellen alleen wordt bepaald door de TCR is het mogelijk om de tumor-specifieke reactiviteit van een T-cel over te brengen naar een T-cel die in eerste instantie niet tumor-actief is. Door middel van kloneren kunnen tumor-specifieke TCRs worden geïsoleerd en worden overgezet naar T-cellen van andere patiënten. Deze strategie heet T-celreceptor gentherapie. Op deze manier kan ook in patiënten die in eerste instantie geen of nauwelijks tumor-specifieke T-cellen bezitten, een tumor-specifieke T-celrespons geïnduceerd worden. Uit een patiënt worden T-cellen geïsoleerd en middels genetische manipulatie wordt de tumor-specifieke TCR in de T-cellen tot expressie gebracht. Deze TCR-gemanipuleerde T-cellen kunnen worden toegediend aan de patiënt. Door alleen gebruik te maken van goed omschreven en onderzochte TCRs wordt de kans verminderd dat de TCR in een patiënt schadelijke bijwerkingen veroorzaakt zoals toxiciteit tegen gezond weefsel. Doordat de T-cellen die gemanipuleerd worden afkomstig zijn van de patiënt, zullen deze T-cellen ook na de manipulatie en het toedienen aan de patiënt tolerant zijn voor gezond weefsel dat de tumor-specifieke epitopen en eiwitten niet tot expressie brengt.

Hoewel wetenschappelijk onderzoek en klinische studies de effectiviteit van TCR gentherapie aantonen, is de brede toepassing van deze strategie in de praktijk nog beperkt door de beperkte hoeveelheid geschikte TCRs. Maligne cellen zijn van oorsprong lichaamseigen

en zijn daardoor moeilijk door het immuunsysteem te herkennen; het peptidoom van maligne cellen bestaat vooral uit zelf-peptiden. Vele van de tot op heden geïsoleerde TCRs herkennen zelf-peptiden gebonden aan autologe HLA-moleculen. Vanwege de tolerantie voor zelf-peptiden gepresenteerd in autologe HLA-moleculen binden deze TCRs met een lage affiniteit aan het epitoom; de interactie tussen de TCR en het epitoom is zwak. Voor optimale T-cel activatie is een grote hoeveelheid epitopen op de oppervlakte van de cellen nodig. Als resultaat kunnen maligne cellen aan deze vorm van therapie ontsnappen; een lage hoeveelheid epitoom leidt niet tot optimale T-celactivatie. Idealer is een hoog-affiene TCR, die een sterke interactie met zijn epitoom aangaat. Ook kleine hoeveelheden epitoom zullen dan in een optimale T-celactivatie resulteren.

Dit proefschrift

Dit proefschrift combineert fundamentele biologische kennis op het gebied van T-celreactiviteit met verschillende technologische platformen om TCRs te identificeren die van belang kunnen zijn voor de behandeling van patiënten met hematologische maligniteiten van B-cel origine. Centraal in elk hoofdstuk staat de immunogeniciteit van allogene HLA-moleculen. Zoals hierboven beschreven zijn zelf-peptiden in autologe HLA-moleculen nauwelijks immunogeen, wat het resultaat is van negatieve selectie tijdens de ontwikkeling van de T-cel in de thymus. Hier staat tegenover dat zelf-peptiden gepresenteerd in allogene HLA moleculen wel sterk immunogeen kunnen zijn, omdat het allogene HLA-molecuul als lichaamsvreemd wordt gezien. Het is dus mogelijk om op deze manier hoog-affiene T-celreceptoren tegen zelf-peptiden te genereren. Dit principe wordt toegepast voor de identificatie van TCRs waarmee het mogelijk moet zijn om selectief B-celmaligniteiten te bestrijden. Deze selectiviteit kan worden geïnduceerd door het kiezen van eiwitten die exclusief in gezonde en maligne B-cellen tot expressie komen, of dan wel B-cel-specifieke eiwitten. Zelf-peptiden afkomstig van deze B-cel-specifieke eiwitten zullen dan uitsluitend in HLA-moleculen op B-cellen gepresenteerd worden. Als gevolg zullen T-cellen die TCRs dragen voor deze eiwitten uitsluitend gezonde en maligne B-cellen uitroeien maar verder andere gezonde weefsels onaangetast laten.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt de isolatie van T-cellen beschreven die gericht zijn tegen het oppervlakte-antigeen CD20. CD20 wordt al als B-cel-specifiek antigeen gebruikt in de behandeling van B-celmaligniteiten met CD20-specifieke therapeutische antilichamen. Om de isolatie van T-cellen te initiëren werd een bekend peptide gekozen dat afkomstig is van CD20 en dat gepresenteerd wordt in het vaak voorkomende HLA-molecuul HLA-A2. Vervolgens zijn peptide-MHC-tetrameren gesynthetiseerd. Peptide-MHC-tetrameren bestaan uit het CD20-peptide gebonden in een HLA-A2 molecuul dat is gekoppeld aan een fluorescerende kleurstof. Door de fluorescerende kleurstof kunnen peptide-MHC-tetrameren en de T-cellen die de peptide-MHC-tetrameren binden gevisualiseerd worden. Met behulp van deze peptide-MHC-tetrameren zijn uit meerdere gezonde individuen die negatief zijn voor het HLA-A2 molecuul T-cellen geïsoleerd die aan deze tetrameren binden. Hoewel

op deze manier duizenden T-cellen zijn geïsoleerd, blijkt minder dan 10% van deze cellen daadwerkelijk specifiek voor het CD20-peptide te zijn. Een groot deel van de geïsoleerde T-cellen miste de affiniteit om het peptide ook te herkennen als het op de natuurlijke manier door een cel gepresenteerd wordt of de T-cellen waren toonden onvoldoende specificiteit voor het CD20-peptide. In de groep van T-cellen die specifiek het CD20-peptide herkenden is er één T-celkloon geïdentificeerd met een zeer hoog-affiene TCR voor het CD20-peptide. Uitgebreid testen van deze T-celkloon liet zien dat deze T-celkloon alleen maligne en gezonde B-cellen herkende maar geen andere gezonde weefsels. Deze resultaten werden bevestigd als de TCR gekloneerd wordt en in andere T-cellen tot expressie wordt gebracht; TCR-gemodificeerde T-cellen herkenden maligne B-cellen, terwijl er geen reactiviteit tegen gezond weefsel, behalve gezonde B-cellen, wordt waargenomen. Bovendien herkenden TCR-gemodificeerde T-cellen maligne B-cellen met zeer lage CD20 expressie, die niet meer vatbaar waren voor therapeutische CD20-specifieke antilichamen. Door de lage CD20 oppervlakte expressie kunnen de antilichamen niet meer binden. Deze vorm van resistenties door lage CD20 expressie kunnen ook in patiënten ontstaan na toediening van therapeutische antilichamen. In dit hoofdstuk wordt aangetoond dat maligne cellen ondanks lage expressie van CD20 nog wel vatbaar zullen zijn voor TCR-gebaseerde therapie.

In **Hoofdstuk 3** wordt de isolatie van T-cellen door gebruik van MHC-tetrameren toegepast om een TCR te isoleren die een door een HLA gepresenteerde peptide afkomstig van het eiwit CD22 herkent. CD22 is een interessant eiwit omdat zijn expressie wederom als B-cel-specifiek is omschreven en in acute lymfoblastische leukemie hoog tot expressie komt. Inderdaad zijn er al klinische studies met CD22-specifieke therapeutische antilichamen gaande.

Het CD22 peptide werd ditmaal geïdentificeerd uit een database die het B-celpeptidoom bevat. Omdat het peptide in het HLA-B7 molecule gepresenteerd werd, worden dit keer peptide-MHC-tetrameren gebruikt die bestaan uit het CD22 peptide en HLA-B7. Met deze peptide-MHC-tetrameren wordt uit een HLA-B7-negatief individu een T-celkloon geïsoleerd. Deze T-celkloon herkende maligne B-cellen maar produceerde geen cytokines na stimulatie met cellen van andere gezonde weefsels. Vervolg experimenten waarin de TCR werd overgezet naar andere T-cellen toonden aan dat de CD22-TCR-gemodificeerde T-cellen ook reactief waren tegen myeloïde cellen, omdat deze cellen ook kleine hoeveelheden CD22 tot expressie brengen. Dit onderzoek toont aan dat antigenen die al gebruikt worden voor antilichaam-gebaseerde therapieën niet onvoorwaardelijk geschikt zijn voor TCR-gebaseerde therapieën. Door de hoge sensitiviteit van deze CD22-specifieke TCR voor kleine hoeveelheden antigenen zullen TCR-gemodificeerde T-cellen niet alleen maligne B-cellen, maar ook gezonde myeloïde cellen uitroeien. Dit is vanuit klinisch oogpunt niet te tolereren. Dat deze toxiciteit nog niet waargenomen is na toediening van CD22-specifieke therapeutische antilichamen zou kunnen samenhangen met het feit dat antilichamen vele malen hogere antigenconcentraties nodig hebben om het immuunsysteem te kunnen activeren.

In **Hoofdstuk 4** wordt de exploitatie van het eiwit CD79b voor TCR-gebaseerde immuuntherapie onderzocht. CD79b vormt een essentieel deel van het B-celreceptorcomplex en wordt daarom al vanaf een vroeg stadium van ontwikkeling in de B-cel tot expressie gebracht.

Verder speelt CD79b een belangrijke rol in de correcte assemblage en de transmissie van signalen door de B-celreceptor. Er is recent aangetoond dat de prognose aanzienlijk slechter is voor patiënten wiens maligne B-cellen CD79b hoog tot expressie brengen.

Drie HLA gepresenteerde peptiden afkomstig van CD79b werden in de literatuur of uit de peptidoomdatabase geïdentificeerd. Vervolgens zijn wederom peptide-HLA-tetrameren geproduceerd en met behulp van de ontwikkelde isolatie strategie zijn drie verschillende T-celklonen geïdentificeerd die specifiek de drie verschillende peptiden herkenden. De CD79b specificiteit van de T-celklonen is met behulp van verschillende testen bevestigd, maar uiteindelijk bleken de geïsoleerde T-celklonen ook hematopoietische stamcellen en T-cellen te herkennen, die CD79b niet op het celoppervlak expresseren. Daarentegen blijkt CD79b wel in kleine concentraties intracellulair in stamcellen en T-cellen aanwezig te zijn. CD79b-peptiden afkomstig van intracellulair CD79b kunnen dus aan het celoppervlak door HLA-moleculen gepresenteerd worden, waarna ze door de CD79b-specifieke T-cellen herkend kunnen worden. Hoewel CD79b in T-cellen en stamcellen tot expressie komt, heeft het in deze cellen geen beschreven functie. Immers brengen T-cellen en stamcellen geen B-celreceptorcomplex tot expressie. Deze aberrante expressie van CD79b maakt het ongeschikt als antigeen voor TCR-gebaseerde therapieën; CD79b-specifieke T-cellen zullen ook de levensnoodzakelijke hematopoietische stamcellen aanvallen.

In **Hoofdstuk 5** wordt het intracellulaire eiwit BOB1 als nieuw antigeen voor TCR-gebaseerde therapieën ontwikkeld. BOB1 wordt als een geschikt antigeen geïdentificeerd omdat zijn expressie vanaf een vroeg ontwikkelingsstadium tot met het meest rijpe B-cel stadium van plasmacel hoog is. Zo brengen ook maligne B-cellen van acute lymfoblastische leukemie maar ook kwaadaardige plasmacellen in multipel myeloom BOB1 hoog tot expressie. In andere weefsels is BOB1 afwezig. Uit de peptidoomdatabase zijn vier peptiden van BOB1 geïdentificeerd die ofwel HLA-A2, ofwel HLA-B7 binden. Door middel van peptide-MHC-tetrameren werd er één T-celkloon geïsoleerd die een hoge sensitiviteit en specificiteit toont voor één van de van BOB1 afkomstige peptiden. Nader onderzoek wijst uit dat deze T-celkloon vele verschillende B-celmaligniteiten zoals acute en chronische leukemie, lymfoom en multipel myeloom herkent, terwijl er geen reactiviteit tegen gezonde hematopoietische en niet-hematopoietische cellen geobserveerd wordt. Deze resultaten worden bevestigd nadat de TCR gekloneerd werd en in andere T-cellen tot expressie werd gebracht; TCR-gemodificeerde cellen herkenden maligne en gezonde B-cellen, maar geen ander gezond weefsel. Dat T-cellen gemodificeerd met deze BOB1-specifieke TCR ook van klinisch belang kunnen zijn wordt verder in een muismodel getest. Muizen worden eerst geïnjecteerd met een multipel-myeloom-cel lijn. Nadat de ziekte zich heeft gemanifesteerd, worden de muizen behandeld met TCR-gemodificeerde of ongemodificeerde T-cellen. Na infusie van TCR-gemodificeerde T-cellen wordt een duidelijke reductie in maligne cellen waargenomen die niet plaatsvindt in muizen die zijn behandeld met normale T-cellen. Dit onderzoek toont aan dat T-cellen die gemodificeerd zijn met de BOB1-specifieke TCR ook in levende organismen een anti-tumorrespons kunnen induceren. Deze resultaten zijn van klinisch belang omdat door middel van deze TCR immunotherapie potentieel toegankelijk kan worden voor patiënten

met multipel myeloom, voor wie op dit moment weinig curatieve behandelingen bestaan. Dit proefschrift beschrijft een methodiek voor de isolatie van T-cellen en TCRs gericht tegen peptiden van a priori gekozen eiwitten. Door gebruik te maken van allogene HLA-moleculen is het mogelijk om TCRs te isoleren met hoge affiniteit voor zelf-antigenen die in maligne cellen tot expressie komen. Door eiwitten te selecteren met een expressie die gelimiteerd is tot maligne en niet-essentiële celpopulaties worden de geïdentificeerde TCRs een bruikbaar middel voor de behandeling van kankerpatiënten middels nieuwe immuuntherapie.

