



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Targeting tumors using T-cell receptor gene transfer: a balance between efficacy and safety

Amerongen, R.A. van

Citation

Amerongen, R. A. van. (2023, November 30). *Targeting tumors using T-cell receptor gene transfer: a balance between efficacy and safety*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3665306>

Version: 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/1887/3665306>

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



APPENDICES

NEDERLANDSE SAMENVATTING

LIST OF PUBLICATIONS

CURRICULUM VITAE

DANKWOORD

NEDERLANDSE SAMENVATTING

HET IMMUUNSISTEEM

Het immuunsysteem is een effectief en specifiek systeem dat het menselijk lichaam beschermt tegen het binnendringen van bacteriën, virussen en pathogenen die lichaamsvreemd en schadelijk zijn. Het immuunsysteem kan het menselijk lichaam ook beschermen tegen kanker. Bij herkenning van lichaamsvreemde antigenen die tot expressie komen op tumorcellen kan een netwerk van verschillende typen immuuncellen actieve immuunsurveillance induceren. Het immuunsysteem bestaat uit een complex netwerk van aangeboren en adaptieve immuuncellen die moeten samenwerken om een effectieve immunrespons te induceren. De belangrijkste effectorcellen bij het controleren van tumorgroei zijn T-cellen en *Natural Killer* (NK)-cellen. Beide celtypen kunnen tumorcellen herkennen en direct vernietigen. Antigeenpresenterende cellen (APC), zoals B-cellen en dendritische cellen, zijn nodig om T-cellen optimaal te activeren of stimuleren. Patiënten die tekenen vertonen van een actieve immunrespons tegen kanker laten vaak een gunstigere prognose zien. Vooral de aanwezigheid van geïnfiltreerde T-cellen in tumoren heeft prognostische waarde. Helaas is het ontwijken van immunologische vernietiging één van de kenmerken van kanker. Wanneer tumoren minder immunogene varianten bevatten, kan het immuunsysteem mogelijk niet alle tumorcellen detecteren en dus tumorgroei reduceren. Deze minder immunogene varianten vertonen verlaagde expressie van tumorspecifieke antigenen of remming van antigeenpresentatie in het algemeen. Bovendien is de immunrespons vaak onderdrukt in tumoren, wat zich uit in de productie van remmende immuunfactoren, werving van remmende immuuncellen en een remmende tumormicro-omgeving.

T-CELLEN

De antigeenspecificiteit van een T-cel wordt bepaald door de T-celreceptor (TCR). Elke T-cel brengt een unieke TCR tot expressie en met behulp van de TCR kunnen T-cellen stukjes eiwit afkomstig van antigenen herkennen. Deze stukjes eiwit worden peptiden genoemd. Als T-cellen een peptide herkennen als lichaamsvreemd, kunnen ze cellen die dit peptide presenteren vernietigen. Peptiden worden gepresenteerd door humaan leukocyten antigenen (HLA). Dit zijn celoppervlakte-eiwitten die voorkomen op humane cellen. Alle HLA-gepresenteerde peptiden op een cel worden samen het HLA-ligandoom genoemd. HLA-klasse I moleculen komen tot expressie op bijna alle humane cellen en HLA-klasse II moleculen komen voornamelijk tot expressie op dendritische cellen, B-cellen en macrofagen. De diversiteit van HLA-moleculen is groot en varieert tussen individuen. Door unieke peptide-bindende eigenschappen van elk HLA-molecuul kunnen de meeste peptiden alleen gepresenteerd worden door één type HLA-molecuul. Dit betekent ook dat TCRs een HLA-bindingrestrictie hebben, de meeste TCRs kunnen één peptide in één HLA-molecuul herkennen. In ieder individu komen miljoenen verschillende TCRs tot expressie. Deze diversiteit is essentieel voor een goed immuunsysteem, mits er een aantal selectiestappen

hebben plaatsgevonden tijdens de ontwikkeling van T-cellen in de thymus. Ten eerste worden alleen T-cellen geselecteerd die in staat zijn om met een lage affiniteit te binden aan het eigen HLA. Ten tweede worden alle T-cellen verwijderd die lichaamseigen peptiden in eigen HLA herkennen. Deze selectiestappen zullen resulteren in een functioneel en zelftolerant T-cel repertoire dat in staat is om lichaamsvreemde peptiden te herkennen zonder het eigen lichaam aan te vallen. Doordat in de thymus alleen HLA-moleculen voorkomen van het individu zelf, is de selectie alleen gericht tegen lichaamseigen peptiden die in eigen HLA-moleculen gepresenteerd worden. In een individu zal daarom nog een groot repertoire van niet-tolerante T-cellen overblijven die peptiden in lichaamsvreemde (allogene) HLA-moleculen kunnen herkennen.

IMMUUNTHERAPIE

Immuuntherapie maakt gebruik van onderdelen van het immuunsysteem om tumorcellen aan te vallen en te vernietigen, met als doel kanker bij patiënten onder controle te houden. Over het algemeen proberen deze therapieën de immuunontwijking van tumoren tegen te gaan door de immuunrespons van de patiënt te moduleren of door immuuncellen in het laboratorium te bewerken en toe te dienen. Er bestaan verschillende soorten immuuntherapieën, waaronder anti-kankervaccinatie, het gebruik van immuuncheckpointremmers, infusie van tumorinfiltrerende lymfocyten (TILs), allogene stamceltransplantatie en adoptieve gentherapie. Bij adoptieve gentherapie kunnen effectorcellen genetisch gemodificeerd worden met TCRs of chimere-antigeenreceptoren (CARs). Het merendeel van deze immuuntherapieën stimuleert, expandeert of verandert T-cellen. Welke therapie geschikt is voor een patiënt hangt af van het type kanker en de aanwezigheid van tumorspecifieke T-celinfiltratie in de tumor. Tumoren met een lage T-celinfiltratie worden 'koude' tumoren genoemd en tumoren met een hoge T-celinfiltratie worden 'hete' tumoren genoemd. De tumormutatiebelasting (TMB), of mutatielading, wordt als een belangrijke factor beschouwd voor de infiltratie van T-cellen. Tumoren met een hoge TMB presenteren een groot aantal mutatie-afgeleide T-celepitopen die door T-cellen als lichaamsvreemd en schadelijk herkend kunnen worden. Deze T-celepitopen kunnen vervolgens resulteren in een groot aantal geïnfiltreerde tumorreactieve T-cellen. Tumoren met gemiddeld de hoogste TMB zijn melanoom en longkanker. Beide tumoren zijn vaak het directe gevolg van DNA-schade veroorzaakt door blootstelling aan UVB-straling of tabak. Therapieën die gebruikmaken van immuuncheckpointremmers of de infusie van TILs vereisen de aanwezigheid van tumorreactieve T-cellen en zijn daarom geschikt voor patiënten met 'hete' tumoren.

Bij patiënten met 'koude' tumoren kunnen T-cellen worden aangepast om niet-gemuteerde antigenen op tumoren te herkennen. Dit kan door middel van respectievelijk anti-kankervaccins en TCR- of CAR-gentherapieën. Deze gerichte therapieën worden vaak ontwikkeld voor een specifiek type kanker. Voor zowel TCR- als CAR-gentherapie worden T-cellen uit het bloed van de patiënt of een donor gehaald. In het laboratorium kunnen deze

T-cellen genetisch aangepast worden met behulp van gentransfer. Bij deze techniek worden T-cellen uitgerust met de genen van een geschikte TCR of CAR, zodat deze T-cellen antigenen op tumoren kunnen herkennen en aanvallen. Een ideaal target voor zowel TCR- als CAR-gentherapie komt hoog en homogeen tot expressie in tumoren en komt niet of nauwelijks tot expressie in gezonde weefsels. TCRs en CARs zijn beide gericht tegen één target, maar vertonen mechanische en functionele verschillen. Het antigeenbindende deel van een CAR is afkomstig van een antilichaam. Hierdoor hebben CARs geen HLA-bindingrestrictie, maar een nadeel is dat CARs hierdoor alleen in staat zijn om eiwitten te herkennen die zich bevinden op het celoppervlak. Doordat TCRs stukjes eiwit kunnen herkennen die gepresenteerd worden door HLA-moleculen, kunnen TCRs alle soorten eiwitten herkennen. HLA-moleculen kunnen eiwitten presenteren die zowel binnenin de cel als op het celoppervlak voorkomen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op TCR-gentherapie.

DIT PROEFSCHRIFT

Het gebruik van TCR-gentherapie voor de behandeling van zowel hematologische als solide tumoren neemt toe. Vooralsnog wordt het brede gebruik van TCR-gentherapie echter belemmerd door een beperkt aantal targetantigenen en HLA-bindingrestricties van de beschikbare TCRs. Een TCR is alleen geschikt voor een patiënt als het targetantigeen op de tumor voorkomt en de HLA-bindingrestrictie overeenkomt met de HLA-typering van de patiënt. Daarnaast hebben verschillende T-celtherapieën aangetoond dat het vinden van de juiste balans tussen therapeutische effectiviteit en veiligheid een uitdaging blijft, omdat er T-celgemedieerde toxiciteiten zijn opgetreden. In de onderzoeken beschreven in dit proefschrift hebben we nieuwe targetantigenen, peptiden en TCRs geïdentificeerd om een bredere patiëntenpopulatie te kunnen behandelen, waaronder patiënten met eierstok- of prostaatkanker. Patiënten met gemetastaseerd eierstok- of prostaatkanker hebben helaas geen curatieve behandelmogelijkheden. Door de lage TMB in de meeste eierstok- en prostaattumoren vallen veel immuuntherapie opties af, maar deze patiënten kunnen mogelijk wel baat hebben bij TCR-gentherapie. Ook beschrijven we in dit proefschrift een onderzoek waarbij we preklinische modellen, afkomstig van humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs), hebben opgezet om toxiciteitsrisico's van T-cellen te testen tegen vitale organen of gespecialiseerde celsubsets.

Een tumor-geassocieerd antigeen (TAA) waar klinische studies vaak tegen gericht zijn, is transcriptiefactor Wilms' tumor gene 1 (WT1). WT1 komt hoog tot expressie in verschillende tumoren, maar dit antigeen komt ook laag tot expressie in een aantal gezonde celtypen. Hoewel deze expressie laag is, zal het immuunsysteem WT1 niet als lichaamsvreemd herkennen en dus tolerant zijn voor WT1. Deze zelftolerantie voor WT1 belemmert de huidige WT1-gerichte vaccinatie- en TCR gentherapiestudies. Daarnaast is er een beperkte set van WT1 peptiden bekend. In **hoofdstuk 2** hebben we aanvullende WT1 peptiden gevonden in het HLA-klasse I ligandome van tumormaterialen afkomstig van patiënten met primaire acute

myeloïde leukemie (AML) of eierstokkanker. We hebben in het bloed van 28 gezonde donoren gezocht naar T-cellen die deze WT1 peptiden konden herkennen. Doordat de HLA-typeringen van deze donoren anders waren dan de HLA-moleculen die deze WT1 peptiden presenteren, vond deze zoektocht plaats in het allogene (lichaamsvreemde) HLA T-celrepertoire. Met deze aanpak konden we de zelftolerantie tegen WT1 omzeilen en isoleerden we potente en specifieke T-celklonen reactief tegen vijf verschillende WT1 peptiden. Met behulp van gentransfer van vier WT1-TCRs naar CD8+ T-cellen, analyseerden we zowel de antitumorpotentie als het veiligheidsprofiel van de TCR-getransduceerde T-cellen (TCR-T-cellen). Deze TCRs herkennen specifiek WT1 peptiden gepresenteerd in veelvoorkomende HLA-klasse I bindingrestrictiemoleculen, namelijk HLA-A*01:01, HLA-A*02:01 of HLA-B*35:01. De TCR-T-cellen herkenden geen van de geïncubeerde gezonde celsubsets en induceerden efficiënte herkenning en vernietiging van primaire tumormaterialen afkomstig van patiënten met AML of eierstokkanker. Onze resultaten tonen aan dat de geïdentificeerde WT1-TCRs veelbelovende kandidaten zijn voor TCR-gentherapiestrategieën bij patiënten met WT1-positieve tumoren, zoals AML en eierstokkanker. Verder laten we in dit hoofdstuk zien dat de door ons gevonden WT1 peptiden beter op tumoren gepresenteerd worden dan de WT1 peptiden die momenteel in klinische studies gebruikt worden. Samengevat suggereren onze data dat betere klinische resultaten behaald kunnen worden met de nieuw ontdekte natuurlijk tot expressie komende WT1 peptiden waarvoor potente TCRs werden gevonden. Onze resultaten laten zien dat de set van vier WT1-TCRs en de natuurlijk tot expressie komende WT1 peptiden de WT1-gerichte therapieën voor patiënten met WT1-positieve tumoren, zoals AML en eierstokkanker, kunnen verbeteren.

In **hoofdstuk 3** hebben we preklinische modellen met hiPSC-afkomstige cardiomyocyten, epicardcellen en nierorganoïden opgezet om toxiciteitsrisico's van tumorspecifieke TCR-T-cellen met klinische potentie te onderzoeken. Deze hiPSCs kunnen in het laboratorium gestimuleerd worden om uit te groeien tot bijna ieder celtype en uiteindelijk zelfs tot weefsels. hiPSCs hebben overeenkomsten met embryonale stamcellen en hebben daarom ook een aantal immature eigenschappen. We onderzochten of deze modellen het gebrek aan *in vitro* screeningopties kunnen opvullen om toxiciteitsrisico's van T-cellen te testen tegen vitale organen of gespecialiseerde celsubsets. CD8+ T-cellen gericht tegen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME), minor histocompatibility antigeen (MiHA) HA-1H, CD20 of WT1, momenteel gebruikt of gepland om te gebruiken in fase I/II klinische studies, werden meegenomen. In het geval van expressie van het antigeen, zoals aangetoond bij huishoudgen USP11 en tumorgen WT1, was *on-target* toxiciteit duidelijk zichtbaar in deze modellen. Meerdere methoden om T-celreactiviteit te meten lieten deze toxiciteit zien, zoals cytokineproductie, de activatie van T-cellen en de capaciteit om cellen te vernietigen. Ook illustreerden fenotypische analyses de interactie tussen geïnfiltreerde T-cellen en nierorganoïden. Samenvattend, lieten we in dit hoofdstuk de toegevoegde waarde zien van hiPSC-afkomstige modellen in de bepaling van toxiciteitsrisico's van tumorspecifieke T-cellen

en benadrukten we de toegevoegde waarde van andere meetmethoden van T-celreactiviteit bovenop de algemeen gebruikte cytokine productie levels van T-cellen. Daarnaast weerspiegelde de reactiviteit van WT1 T-cellen tegen hiPSC-afkomstige nierorganoiden en epicardcellen het immature fenotype van de modellen, maar deze reactiviteit gaf ook mogelijke toxiciteitsrisico's aan van WT1-gerichte therapieën.

We selecteerden PRAME, CCCTC-binding factor (CTCFL), en claudin-6 (CLDN6) als potentiële targets voor de behandeling van patiënten met eierstokkanker in **hoofdstuk 4**. Deze antigenen worden geclassificeerd als kankertestisantigenen (CTAs) of TAAs en ze komen hoog en differentieel tot expressie in eierstokkanker, zonder expressie in risicovolle gezonde weefsels. CTAs zijn een groep antigenen die voornamelijk op testis en kankercellen tot expressie komen. Omdat de testis een immuun geprivilegieerd orgaan is, met afwezigheid van HLA-klasse I expressie en aanwezigheid van Sertoli cellen die een bloed-testisbarrière vormen, veroorzaakt de expressie van deze antigenen op testis geen toxiciteitsrisico. In het HLA-klasse I ligandoom van tumormaterialen van patiënten met eierstokkanker en cellijnen hebben we natuurlijk tot expressie komende peptiden afkomstig van deze antigenen geïdentificeerd. Vervolgens hebben we hoog-afide T-celklonen gevonden die deze peptiden herkenden in het bloed van gezonde donoren met andere HLA-typeringen. In totaal werden drie PRAME TCRs en één CTCFL TCR van de meest veelbelovende en veilige T-celklonen geanalyseerd en getransduceerd in CD8+ T-cellen. De PRAME TCR-T-cellen, gericht tegen PRAME peptiden gepresenteerd in HLA-A*02:01, HLA-A*24:02 of HLA-B*07:02, lieten potente en specifieke antitumorreactiviteit zien. Om de klinische relevantie van deze TCR-T cellen verder te onderzoeken hebben we gebruikgemaakt van een muismodel. De muizen werden geïnjecteerd met PRAME positieve tumorcellen en na voldoende uitgroei van de tumor werden ze behandeld met PRAME TCR-T cellen. Ook in de muizen waren de PRAME TCR-T cellen in staat om de tumoren aan te vallen. De CTCFL TCR-T-cellen, gericht tegen een CTCFL peptide gepresenteerd in HLA-A*02:01, herkenden efficiënt tumormaterialen van patiënten met eierstokkanker en eierstoktumorcellijnen behandeld met het demethylerende middel 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC). Concluderend beschouwen we de selectie van potente PRAME en CTCFL TCRs als veelbelovende kandidaten voor patiënten met eierstokkanker of andere PRAME- of CTCFL-positieve tumoren. Ook verwachten we dat onze selectie van antigenen en peptiden het gebruik van TCR-getherapieën voor patiënten met eierstokkanker zal vergroten.

Tot slot, in **hoofdstuk 5** selecteerden we kallikrein-gerelateerde peptidasen 2, 3 en 4 (KLK2, KLK3, KLK4) en homeobox B13 (HOXB13) als strikt prostaatspecifieke antigenen die gebruikt kunnen worden als target voor de behandeling van prostaatkanker. Bij patiënten met vergevorderde prostaatkanker wordt de gezonde prostaat vaak verwijderd. Hierdoor zijn de risico's om antigenen aan te vallen die op zowel tumor als gezond prostaatweefsel tot expressie komen aanvaardbaar. In dit onderzoek hebben we in het HLA-klasse I

ligandoom van tumorcellen een selectie van prostaatspecifieke peptiden geïdentificeerd die worden gepresenteerd in de context van HLA-klasse I. Om immunologische tolerantie voor prostaatspecifieke antigenen te vermijden, hebben we weer in het bloed van gezonde donoren met andere HLA-typeringen gezocht naar hoog-afide T-celklonen. Van de geïsoleerde T-celklonen herkenden drie KLK4-HLA-A*02:01 reactieve T-celklonen en twee KLK3-HLA-B*35:01 reactieve T-celklonen de prostaattumorcellijnen het meest efficiënt en antigeenspecifiek. Deze T-celklonen lieten geen detecteerbare *on-target off-tumor* of *off-target* reactiviteit zien. We hebben hun TCRs geanalyseerd en na TCR-gentransfer in CD8+ T-cellen vertoonden de TCRs potente prostaatspecifieke cytokineproductie en cytotoxische potentie. We hebben ook gebruikgemaakt van een muismodel om de klinische relevantie van deze TCR-T cellen verder te onderzoeken. De TCR-T cellen zorgden ervoor dat de geïnjecteerde tumorcellen in deze muizen compleet verdwenen. We beschouwen deze TCRs als veelbelovende kandidaten voor de behandeling van patiënten met prostaatkanker. Over het geheel genomen hebben we aangetoond dat KLK3 en KLK4 effectief kan worden aangevallen met TCR-gentransfer. Daarnaast kan onze set van natuurlijk tot expressie komende HLA-klasse I-bindende KLK2, KLK3, KLK4 en HOXB13 peptiden gebruikt worden om aanvullende prostaatreactieve TCRs te identificeren.

Samenvattend beschrijven we in dit proefschrift tien TCRs met potentie voor klinisch gebruik. Door de T-celreactiviteit uitgebreid te testen hebben we vastgesteld dat deze TCRs reactief zijn tegen tumormaterialen, zonder gezonde cellen aan te vallen. Deze TCRs zijn gericht tegen verschillende tumor- en prostaatspecifieke antigenen en hebben veelvoorkomende HLA-bindingrestricties. Daarmee zijn deze TCRs een waardevolle aanvulling op het beperkt aantal beschikbare TCRs. Verder kunnen de tumor- en weefselspecifieke targetantigenen, geselecteerd met behulp van differentiële genexpressieanalyses, bijdragen aan de identificatie van nieuwe TCRs. In dit proefschrift hebben we ook laten zien dat hiPSC-afkomstige modellen een toegevoegde waarde hebben bij het bepalen van toxiciteitsrisico's in de preklinische ontwikkeling van TCRs.

