



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting MHC-I related proteins for cancer diagnosis and therapy

Verhaar, E.R.

Citation

Verhaar, E. R. (2024, July 4). *Targeting MHC-I related proteins for cancer diagnosis and therapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3766089>

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/1887/3766089>

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

Appendices

Nederlandse samenvatting

Algemene introductie

De meest voorkomende soorten kanker in de Verenigde Staten zijn prostaat-, long- en darmkanker bij mannen, en borst-, long-, en darmkanker bij vrouwen. Dankzij wetenschappelijk onderzoek in de afgelopen decennia is de overlevingskans van kanker aanzienlijk is gestegen, maar het is een aandoening die nog steeds verantwoordelijk is voor ongeveer 15% van alle sterfgevallen wereldwijd. Patienten worden vaak behandeld met chemotherapie, bestraling, of operatief om de tumor te verwijderen. Ondanks de effectiviteit van deze behandelingen zijn ze niet voor elke patient geschikt. Veel van deze vormen van therapie hebben ook ernstige bijwerkingen.

Een relatief nieuwe vorm van behandeling waar recent veel voortgang mee is geboekt is immunotherapie. Hierbij wordt het imuunsysteem van de patient zelf ingezet om kankercellen te herkennen en elimineren. Dit gebeurt onder andere door middel van antilichamen die bepaalde doeleiwitten, of antigenen, op de tumor herkennen. Deze antilichamen kunnen dan bijvoorbeeld medicijnen gericht naar de tumorcel brengen, de functie van de herkende eiwitten blokkeren, of immuuncellen activeren. Een andere vorm van immuuntherapie is gebaseerd op genetische manipulatie van de cellen van de patient zelf. Een voorbeeld van deze vorm van celtherapie maakt gebruik van chimere antigeen receptor (CAR) T cellen of CAR 'natural killer' (NK) cel therapie. CAR T of CAR NK cellen zijn lymfocyten die genetisch gemodificeerd zijn met als uiteindelijk doel om tumorcellen te herkennen en doden. Een voordeel van CAR NK cellen over CAR T cellen is dat NK cellen een minder kans geven op 'graft versus host disease' (GVDH)²¹¹⁻²¹⁵ met minder bijwerkingen veroorzaakt door overproductie van cytokines, zoals vaak wordt gezien na behandeling met CAR T cellen²¹⁷. NK cellen zijn daarnaast makkelijker te isoleren uit donorbloed, navelstrengbloed, pluripotente stamcellen, en cellijnen zoals NK-92²⁰⁵⁻²¹⁰.

Het CAR gedeelte van zo'n cel bestaat vaak uit een extracellulair 'single-chain variable fragment' (scFv), dat het tumor-antigeen herkent. Het intracellulaire gedeelte van een CAR bestaat uit domeinen betrokken bij signaal transductie om zo de T cel te activeren wanneer de CAR T of CAR NK cel het tumor-antigeen herkent. Het voor dat doel meest gebruikte domein is afkomstig van

het cytoplasmatisch segment van het CD3 ζ eiwit, in combinatie met CD28 of 4-1BB. Activatie van een CAR-dragende cel leidt tot een cytotoxisch effect en dus celdood van de tumorcel, dankzij de productie en uitscheiding van cytokines en cytotoxische eiwitten door de CAR T of NK cel.

Bij de meeste vormen van immuuntherapie is het dus belangrijk om een tumor-specifiek of tumor-geassocieerd doeleiwit ('target') te hebben dat door de immuuncellen of antilichamen kan worden herkend. In dit proefschrift beschrijf ik een aanpak gecentreerd op twee tumor-geassocieerde antigenen: MICA en HLA-E.

MICA

MICA, en het daaraan verwante MICB, komen voor op het oppervlak van cellen die door een virale infectie of transformatie tot tumorcel, gestressed zijn. Gezonde cellen brengen doorgaans geen MICA/B tot expressie. MICA/B is een ligand voor de activerende NKG2D receptor, aanwezig op NK cellen en cytotoxische T lymfocyten. Als MICA/B bindt aan NKG2D wordt de immuuncel geactiveerd en wordt de MICA/B-positieve cel gedood door uitscheiding van cytokinen en cytotoxische eiwitten zoals Granzyme B. MICA/B komt vaak voor op het celoppervlak van tumorcellen van hematopoietische oorsprong, maar ook op veel epitheliale tumoren, bijvoorbeeld darmkanker, eierstokkanker, baarmoederhalskanker, borstkanker, alvleesklierkanker, melanoom, en galblaaskanker.

In dit proefschrift beschrijven we de ontwikkeling van MICA-specifieke 'nanobodies'. Een 'nanobody', ook wel VHH genoemd, is het recombinant tot expressie gebrachte variabele segment van zware-keten antilichamen. 'Nanobodies' zijn klein: waar conventionele antilichamen een massa hebben van 150kDa, hebben 'nanobodies' een massa van 15kDa. Hierdoor penetreren ze makkelijker dieper in weefsels, zijn ze relatief eenvoudig te produceren, zijn ze stabiel bij hogere temperaturen en andere omstandigheden, en hebben ze uitstekende capaciteit om hun antigeen te binden.

MICA-specifieke nanobodies detecteren MICA op cellen en tumoren

We hebben nanobodies ontwikkeld door een alpaca te immuniseren met recombinant MICA eiwit. Na immunisatie werden de B cellen van de alpaca geïsoleerd en gebruikt om een bibliotheek van de variable segmenten van 'heavy chain-only' antilichamen te maken. Deze bibliotheek wordt in bacteriofagen tot expressie gebracht en geselecteerd op 'nanobodies' die aan

MICA binden. In totaal hebben we 8 verschillende nanobodies tegen MICA gevonden, waarvan we er twee geselecteerd hebben voor verdere toepassingen. Deze nanobodies, VHH-A1 en VHH-H3, binden beide aan MICA met hoge affiniteit (~ 0.2 en ~ 0.4 nM, respectievelijk), herkennen de allelen MICA*008 en MICA*009 (welke aanwezig zijn bij meer dan de helft van de menselijke populatie), en kunnen worden gebruikt in een immunoblot. Beide nanobodies herkennen verschillende epitopen op MICA en kunnen dus tegelijkertijd gebruikt worden voor verschillende doeleinden. De nanobodies herkennen MICA op het celoppervlak van MICA-positieve kankercellen B16F10 (melanoom) en EL-4 (T-cel lymfoom) (Hoofdstuk 3, Figuur 2). In deze cellijnen, afkomstig van de muis, wordt het MICA eiwit door middel van transfectie tot expressie gebracht.

MICA-specifieke nanobodies voor immunotherapie: nanobody-drug conjugate

Een vorm van immuuntherapie in opkomst is het gebruik van zogenaamde ‘antibody-drug conjugates’ (ADCs), waarbij celdodende medicijnen aan antilichamen worden gekoppeld. Wanneer het antilichaam aan het antigeen bindt wordt de celdodende stof specifiek aan de tumorcel afgeleverd. Dit staat in principe een enorme reductie toe in de hoeveelheid cytostaticum waaraan de patient wordt blootgesteld.

Wij gebruikten VHH-A1 gekoppeld aan de microtubulus-remmer Mertansine (DM1) als ‘nanobody-drug conjugate’ (NDC). We zagen dat MICA⁺ EL-4 cellen behandeld met VHH-A1-DM1 aanmerkelijk gevoeliger zijn voor de NDCs dan wildtype (WT) EL-4 cellen, of MICA⁺ EL-4 cellen behandeld met een niet-specifieke NDC (VHH_{MHCII}-DM1; EL-4 cellen brengen geen MHC-II tot expressie). We kunnen dus hetzelfde celdodende effect bereiken met een lagere dosis van het medicijn. We testten de specificiteit van VHH-A1-DM1 door MICA⁺ en WT EL-4 cellen te mengen en te behandelen met VHH-A1-DM1, VHH_{MHCII}-DM1, of vrij DM1. Celdood werd gemeten door middel van cytometrie. We zagen een significante afname in het aantal MICA⁺ cellen ten opzichte van WT cellen na toevoeging van VHH-A1-DM1. De cellen behandeld met VHH_{MHCII}-DM1 of vrij DM1 laten daarentegen een vergelijkbare afname zien in het aantal MICA⁺ cellen en WT cellen (Hoofdstuk 3, Figuur 3)

MICA-specifieke nanobodies voor immunotherapie: CAR NK cellen

Zoals eerder genoemd zijn CAR T cellen immuuncellen die zodanig genetisch gemodificeerd zijn om specifiek tumorcellen te herkennen en doden. In ons geval gebruiken we de nanobodies VHH-A1 en VHH-H3 als extracellulair antigeen herkennings domein, en als signaaldomeinen maken we gebruik van CD3 ζ en CD28. In plaats van CAR T cellen, hebben we CAR NK cellen geproduceerd, welke afgeleid zijn van de NK-92 cellijn.

De CAR NK cellen, A1 CAR NK en H3 CAR NK, samen met een “empty vector” (EV) CAR NK als negatieve controle, werden geproduceerd door transductie met lentivirus dat codeert voor het CAR construct. We bevestigden expressie van het CAR construct door de aanwezigheid van GFP te meten met immunoblot en cytometrie, en door CD3 ζ expressie aan te tonen in een immunoblot. We stelden WT en MICA⁺ B16F10 en EL-4 cellen bloot aan de CAR NK cellen en zagen een significante hoeveelheid celdood in MICA⁺ cellen in aanwezigheid van A1 en H3 CAR NK cellen, maar niet wanneer EV CAR NK cellen werden gebruikt. WT cellen blootgesteld aan A1, H3, of EV CAR NK cellen lieten minder celdood zien. We zagen activatie van CAR NK cellen aan de hand van een toename in expressie van IFN- γ in de A1 en H3 CAR NK cellen in combinatie met MICA⁺ tumorcellen, maar niet in combinatie met WT tumorcellen (Hoofdstuk 5, Figuur 2).

Een mogelijke behandeling van tumoren met de A1 CAR NK cellen werd onderzocht in muizen. We behandelden MICA⁺ B16F10 tumor-dragende muizen met A1 CAR NK cellen of EV CAR NK cellen. De muizen behandeld met A1 CAR NK lieten een significant tragere tumorgroei zien met een grotere overlevingskans dan muizen behandeld met EV CAR NK (Hoofdstuk 5, Figuur 3).

We toonden aan dat de CAR NK cellen specifiek naar de MICA⁺ tumoren gaan door middel van immuno-PET. Hiertoe gebruikten we een “nanobody” dat de transferrin receptor herkent. De nanobody herkent specifiek de humane versie van deze receptor, welke op de NK-92 cellen te vinden is, maar niet de receptor op de cellen van de muis. We injecteerden muizen met MICA⁺ B16F10 longmetastasen met EV CAR NK cellen of A1 CAR NK cellen, en de “nanobody” gelinkt aan ⁸⁹Zr. Tot 72 uur na injectie zien we een specifiek signaal in de longen van de muizen welke de A1 CAR NK cellen ontvingen, maar niet in de longen van de muizen geïnjecteerd met EV CAR NK cellen (Hoofdstuk 5, Figuur 4).

Conclusie

We hebben 'nanobodies' ontwikkeld tegen MICA, een MHC-I gerelateerd eiwit dat veel voorkomt op verschillende tumoren en op cellen die als gevolg van cellulaire 'stress' door het immuunsysteem moeten worden verwijderd. Deze 'nanobodies' kunnen worden ingezet voor diagnose en behandeling van MICA⁺ tumoren, bijvoorbeeld met behulp van cytometrie en immunoblot. Voor de behandeling van kanker kunnen we de nanobodies inzetten als nanobody-drug conjugate (NDC), gekoppeld aan de microtubulus inhibitor DM1. We verwachten dat andere celdodende medicijnen eveneens kunnen worden gebruikt in de vorm van een NDC. We hebben hoge verwachtingen dat we, na verdere optimalisering, de NDCs kunnen gebruiken voor behandeling van MICA⁺ tumoren in muizen.

Door de nanobodies te gebruiken als extracellulair, antigeen-bindend domein van een CAR construct hebben we MICA-specifieke CAR NK cellen gegenereerd. Deze cellen zijn in staat MICA⁺ tumorcellen specifiek te herkennen en doden in celweek. In muizen met MICA⁺ tumoren leidde de behandeling met A1 CAR NK cellen tot een tragere tumorgroei en verbeterde levensverwachting, in vergelijking met muizen behandeld met niet-specifieke CAR NK cellen.

Omdat MICA niet op gezonde cellen voorkomt, verwachten we weinig bijwerkingen bij eventuele klinische toepassing. Dit zou men kunnen onderzoeken door de MICA-specifieke nanobodies te testen in apen, welke een vergelijkbare versie van MICA hebben als mensen.

HLA-E

MHC-I eiwitten zijn aanwezig op het oppervlak van elke kernhoudende cel. MHC-I presenteert fragmenten in de vorm van peptiden van voornamelijk cytosolaire eiwitten aan cytotoxische T cellen. Een gezonde cel presenteert fragmenten van zijn eigen intracellulaire eiwit repertoire. Tijdens de ontwikkeling van het immuunsysteem worden T cellen op juist deze complexen gecalibreerd om mogelijke reactiviteit met lichaamseigen eiwitten te vermijden. Als een cel geïnfecteerd is met een bacterie of virus, of door mutaties getransformeerd is tot tumorcel, presenteert de cel fragmenten van deze lichaamsvreemde eiwitten aan het celoppervlak als een complex met MHC-I. De cytotoxische T cel herkent deze complexen en doodt de cel die ze draagt. Sommige geïnfecteerde cellen of tumorcellen voorkomen deze celdood door de expressie van MHC-I eiwitten uit te schakelen.

HLA-E is een uniek MHC-I eiwit dat peptiden presenteert die afkomstig zijn van de andere MHC-I eiwitten, of van virale membraaneiwitten. Met name de signaalsequenties, verantwoordelijk voor de insertie van uitgescheiden en membraan eiwitten in het endoplasmatisch reticulum, worden door HLA-E gepresenteerd. HLA-E is een ligand voor de NKG2A en NKG2C receptoren op NK cellen. NKG2A is een inhibitoire receptor, dus als HLA-E aan deze receptor bindt worden de NK cellen en cytotoxische T cellen geïnactiveerd. HLA-E wordt veel gezien op verschillende tumoren van hematopoietische en epitheliale oorsprong. Expressie van HLA-E is vaak geassocieerd met een slechtere prognose in long kanker, glioom, nierkanker, darmkanker, borstkanker, en eierstokkanker.

De extracellulaire domeinen vertonen een sterke mate van sequentie homologie voor de producten van de HLA-A, -B, -C en -E loci. Het ontwikkelen van een antilichaam dat specifiek HLA-E herkent, zonder kruisreactie met allelen van de HLA-A, -B en -C loci is niet eenvoudig gebleken. Echter, het intracellulaire deel van HLA-E, ook wel de cytoplasmatische ‘staart’ genoemd, is wat aminozuurvolgorde betreft uniek. De cytoplasmatische staart van MHC-I moleculen, en van HLA-E in het bijzonder, speelt een rol bij het transport van het endoplasmatisch reticulum (ER) naar het celoppervlak, alsook in de internalisatie en recycling, zowel vanaf het celoppervlak en vanuit endosomen^{281,282}. Omdat de ‘staart’ van HLA-E uniek is, en gezien de mogelijke rol bij stabilisatie en expressie van HLA-E op het celoppervlak, is dit een interessant doelwit om antilichamen tegen te ontwikkelen.

Ontwikkeling van een monoclonaal antilichaam tegen de cytoplasmatische staart van HLA-E

Het cytoplasmatische domein van HLA-E heeft als aminozuurvolgorde “SKAEWSDSAQGSESHL” (hierna HLA-E_{tail} genoemd). Door middel van een Sortase reactie⁵⁵³ hebben we HLA-E_{tail} gekoppeld aan VHH_{MHCII}, welk MHC-II in muizen herkent. Gebaseerd op eerder onderzoek in ons lab verbetert de koppeling van een peptide antigeen aan VHH_{MHCII} de immuunrespons tegen het peptide ⁵⁵⁸. Na immunisatie kozen we de muis met het hoogste titer voor productie van monoclonale antilichamen tegen HLA-E_{tail}. De antilichamen herkennen het epitoop “WSDSAQGSESHL”, een aminozuursequentie die uniek en alleen wordt aangetroffen in de cytoplasmatische ‘staart’ van HLA-E (Hoofdstuk 7, Figuur 2).

Deze sequentie, ingebouwd aan de C- of N-terminus, of ingevoegd in het midden van een onverwant eiwit, wordt herkend door de monoclonale antilichamen in immunoblot en in immunoprecipitatie experimenten (Hoofdstuk 7, Figuur 5). We hebben ook laten zien dat het 19-H12 antilichaam gebruikt kan worden in immunoblot, immunofluorescentie, cytometrie, en immunohistochemie. Vergeleken met het veelgebruikte MEM-E/02 antilichaam kunnen we het 19-H12 antilichaam gebruiken in immunohistochemische analyse van blaaskankerbiopten (Hoofdstuk 7, Figuur 6 en Figuur 7).

We hebben de C-terminus van de zware en lichte ketens van 19-H12 gemodificeerd met een LPETG sortase motief en een 6-Histidine 'tag'. De 6-Histidine 'tag' vergemakkelijkt de zuivering van de geproduceerde antilichamen met behulp van een NiNTA kolom. Het LPETG sortase motief maakt het mogelijk om specifiek de C-termini van de zware en lichte ketens te modificeren met een fluorofoor of biotine molecuul. Dit maakt het gebruik van een secundair antilichaam overbodig en staat detectie van 19-H12 toe met behulp van 'horse radish peroxidase' (HRP) (Hoofdstuk 7, Figuur 4). De C-termini van de zware en lichte ketens spelen geen rol bij de interactie van antilichaam met het antigeen. De sortase modificaties van het 19-H12 antilichaam hebben dus geen invloed op antigeenherkenning.

Conclusie

Het door ons ontwikkelde antilichaam, 19-H12, herkent een epitoom van ~13 aminozuren dat enkel aanwezig is als het intracellulaire deel van HLA-E. De combinatie van antilichaam en epitoom kan dus worden gebruikt als 'epitope-tag' voor de detectie en/of zuivering van eiwitten. Het 19-H12 antilichaam herkent dit epitoom in immunoblot, in cytometrie, immunofluorescentie, en immunohistochemie. We hebben een variant van het antilichaam gemaakt dat aan de C-termini van de zware en lichte ketens gemodificeerd is met een sortase motief, waardoor enzymatische modificatie met een fluorofoor, biotine, of ander molecuul mogelijk is. Doordat het cytoplasmatische deel van HLA-E betrokken is bij de stabiliteit van het molecuul op het celmembraan, is de beschikbaarheid van een antilichaam specifiek voor deze determinant nuttig voor verder onderzoek naar de eigenschappen van HLA-E.

