



**Universiteit  
Leiden**  
The Netherlands

## **TCRs as precision tools against B-cell and plasma cell malignancies**

Meeuwsen, M.H.

### **Citation**

Meeuwsen, M. H. (2024, October 1). *TCRs as precision tools against B-cell and plasma cell malignancies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4093497>

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/1887/4093497>

**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 immuunsysteem

De functie van het immuunsysteem is om ons lichaam te beschermen tegen ziekteverwekkers zoals bacteriën en virussen. Het immuunsysteem is een complex systeem bestaande uit verschillende soorten cellen die, ieder met hun eigen functie, onderling samenwerken om ziekteverwekkers onschadelijk te maken. Twee belangrijke celtypen die een rol spelen in het onderzoek beschreven in dit proefschrift zijn de B-cellen en de T-cellen. Zowel B- als T-cellen kunnen, middels receptoren die zij op hun celoppervlak dragen, onderscheid maken tussen de 'bekende' gezonde weefsels van het eigen lichaam en vreemde structuren zoals door virussen of bacteriën geïnfecteerde weefsels. B-cellen ontwikkelen zich tijdens een infectie tot plasmacellen. Deze cellen produceren antilichamen die binnengedrongen ziekteverwekkers kunnen binden. De ziekteverwekkers worden hierdoor voorzien van herkenningsstructuren waardoor andere immuuncellen de bacteriën en virussen opnemen en doden.

T-cellen kunnen geïnfecteerde cellen herkennen via de T-celreceptor (TCR), een eiwit dat zich op het oppervlak van T-cellen bevindt. Lichaamscellen presenteren continu peptiden, kleine fragmenten afkomstig van de eiwitten aanwezig in de cel, die in humaan leukocytenantigeen (HLA) op het celoppervlak komen. Wanneer een antigeen, een peptide afkomstig van een lichaamsvreemd eiwit, in HLA gepresenteerd wordt, kan dit vervolgens door T-cellen via de TCR worden herkend. T-cellen die middels hun TCR een antigeen herkennen, worden geactiveerd. Dit heeft verschillende gevolgen. Voor cytotoxische T-cellen is de belangrijkste uitkomst dat geïnfecteerde cellen worden aangevallen en gedood.

Naast het herkennen van geïnfecteerde cellen zijn T-cellen in sommige gevallen ook in staat om tumorcellen, die als gevolg van DNA-schade gemuteerde peptide presenteren, te herkennen. Dit kan echter alleen plaatsvinden wanneer een tumorcel zoveel DNA-schade heeft dat de T-cellen hem kunnen onderscheiden van gezonde lichaamscellen. Vaak is dit niet het geval waardoor tumoren niet worden aangevallen en ongecontroleerd kunnen groeien en ziekte veroorzaken. Wanneer T-cellen wel in staat zijn om tumorcellen te herkennen, kan het voorkomen dat de tumorcellen zich over tijd zo ontwikkelen dat ze T-cel-activatie kunnen remmen en daardoor niet langer worden aangevallen.

### B-celmaligniteiten

Kanker kan ontstaan doordat in cellen een ophoping van DNA-mutaties heeft plaatsgevonden. Deze mutaties kunnen een combinatie zijn van spontane DNA-afwijkingen en van DNA-schade opgelopen door blootstelling aan externe invloeden. Wanneer DNA-mutaties hebben plaatsgevonden in genen die verantwoordelijk

zijn voor het reguleren van celdeling en geprogrammeerde celdood kunnen cellen ongecontroleerd gaan delen. Afhankelijk van de afkomst van de cel van origine ontstaat een bepaald type kanker. Wanneer B-cellen of plasmacellen maligne transformatie ondergaan ontstaan B-cel- of plasmacelmaligniteiten.

### **Genetisch gemodificeerde T-cellen als kankerbehandeling**

CAR-T-celtherapie, wat staat voor Chimeric Antigen Receptor T-celtherapie, is een innovatieve vorm van immuuntherapie die kan worden gebruikt voor de behandeling van B-celmaligniteiten. CARs zijn artificiële eiwitten gebaseerd op de structuur van antistoffen. CARs worden ontworpen om te binden aan eiwitten die specifiek tot expressie komen op het oppervlak van kankercellen, in dit geval B-cel-specifieke eiwitten. Een voorbeeld van een eiwit waar CAR T-cellen tegen kunnen zijn gericht is het CD19-eiwit op het oppervlak van B-cellen.

Het proces van CAR-T-celtherapie begint met het verzamelen van de eigen T-cellen van de patiënt. Vervolgens worden deze T-cellen voorzien van de genetische informatie die codeert voor de CAR. Nadat de T-cellen genetisch zijn gemodificeerd om de CARs tot expressie te brengen, worden ze in grote aantallen in het laboratorium vermeerderd. Vervolgens worden ze teruggegeven aan de patiënt via een infusie. Wanneer deze CAR T-cellen in het lichaam een kankercel vinden die het doeleiwit draagt, bindt de CAR aan het oppervlak van de kankercel en activeert de T-cel om deze te vernietigen.

CAR-T-celtherapie heeft bijzondere successen behaald in de behandeling van B-celmaligniteiten, waaronder genezing van een aanzienlijk aantal patiënten. Echter, een belangrijke beperking is het fenomeen van antigeenverlies, waarbij tumoren veranderingen ondergaan en ze het doeleiwit verliezen, wat de effectiviteit van de therapie kan hinderen. Dit laat zien dat het ontwikkelen van nieuwe en aanvullende therapieën belangrijk is.

### **Dit proefschrift**

Om in de toekomst meer patiënten te kunnen genezen is het belangrijk behandelingen te ontwikkelen die CAR T-cellen kunnen complementeren en in de toekomst wellicht tegelijkertijd als behandeling kunnen worden ingezet om zo het fenomeen van antigeenverlies te kunnen compenseren. Als behandeling focussen wij ons op TCR T-cellen die in staat zijn om peptiden afkomstig van B-cel-specifieke eiwitten te herkennen. Het voordeel van TCR T-cellen is dat ze peptiden afkomstig van zowel intracellulaire als oppervlakte eiwitten kunnen herkennen en daardoor een breder arsenaal hebben dan CAR T-cellen. Het doel van dit proefschrift is om zoveel mogelijk TCRs te identificeren die in de toekomst eventueel gebruikt kunnen worden voor TCR-T-celtherapie bij de behandeling van B-celmaligniteiten en multipel myeloom.

In **hoofdstuk 2** hebben we een brede zoektocht uitgevoerd om TCRs te identificeren voor de therapie van B-cel- en plasmacelmaligniteiten. We begonnen met het selecteren van potentiële doeleiwitten voor TCR-gentherapie van deze maligniteiten. Hierbij maakten we gebruik van genexpressiedata van patiënten met acute lymfatische leukemie, chronische lymfatische leukemie en multipel myeloom en van gezonde cellen. We selecteerden genen die tot expressie kwamen in een van de maligniteiten, terwijl de expressie in gezonde cellen, met uitzondering van B-cellen, afwezig was. Deze aanpak leverde 28 doeleiwitten op die veelbelovend zouden kunnen zijn voor de therapie van B-cel- en plasmacelmaligniteiten. We identificeerden peptiden afkomstig van deze eiwitten, gepresenteerd in HLA op het oppervlak van maligne B-cellen door middel van peptide-elutie en massaspectrometrie. Onze selectie van doel-HLA-allelen omvatte HLA-A\*01:01, -A\*24:01, -B\*08:01 en -B\*35:01. Twintig doelpeptiden afgeleid van een van de geselecteerde eiwitten gepresenteerd in een van de gekozen HLA-moleculen werden geïdentificeerd. Om immunologische tolerantie te omzeilen, werden T-celklonen geïsoleerd uit materiaal van gezonde donoren die de HLA-allelen van interesse niet tot expressie brachten. Door middel van peptide-HLA-multimeren isoleerden we 5519 T-celklonen. Hierna identificeerden we via screenings 23 T-celklonen specifiek voor een van de doelpeptiden, met functionele reactiviteit tegen van nature gepresenteerd antigeen. We bepaalden de sequenties van de TCRs van zes T-celklonen die gevoelig genoeg waren om B-celmaligniteiten te herkennen en aan te vallen. Na TCR-overdracht naar donor-T-cellen herkenden en doodden TCR T-cellen effectief en specifiek B-celmaligniteiten. De geselecteerde TCRs herkennen peptiden afkomstig van FCRL5, gepresenteerd in HLA-A\*01:01, VPREB-3 in HLA-A\*24:02 en BOB1 in HLA-B\*35:01. Afhankelijk van het expressieprofiel van de doeleiwitten zijn deze TCRs waardevol voor behandeling van een of meerdere typen B-cel- en plasmacelmaligniteiten.

In **Hoofdstuk 3** hebben we TCRs geïdentificeerd die peptiden herkennen van de joining chain (Jchain), die kunnen worden gebruikt voor de behandeling van multipel myeloom. In Hoofdstuk 2 was de Jchain al geïdentificeerd als een van de doeleiwitten voor de therapie van B-cel- en plasmacelmaligniteiten. In gezonde plasmacellen fungeert de Jchain als een verbindingsmolecuul tussen monomeren van IgA en IgM wanneer ze als multimeren worden uitgescheiden. De *JCHAIN* expressie in multipel myeloomcellen is onafhankelijk van het immunoglobuline-isotype dat wordt geproduceerd, en de *JCHAIN* komt hoog tot expressie in de meeste multipel myeloom tumoren. Omdat de Jchain een eiwit is dat door cellen wordt uitgescheiden, kan het niet worden herkend door CAR T-cellen. TCR T-cellen specifiek voor Jchain-afkomstige peptiden kunnen wel worden gebruikt om *JCHAIN*-positieve cellen aan te vallen. Ons doel in dit hoofdstuk was om TCRs te identificeren die Jchain-peptiden gepresenteerd in verschillende HLA-A-allelen kunnen herkennen. Doelpeptiden afgeleid van de Jchain gepresenteerd in HLA werden geïdentificeerd uit het HLA-klasse-I-peptidoom van multipel myeloom-cellen.

Met behulp van de pHLA-multimer-technologie, zoals gebruikt in Hoofdstuk 2, werden Jchain-specifieke T-celklonen geïsoleerd. Dit resulteerde in de identificatie van vier T-celklonen die Jchain-peptiden gepresenteerd in HLA-A\*01:01, -A\*03:01, -A\*11:01, of -A\*24:02 goed herkenden. Deze Jchain-specifieke T-cellen lieten veelbelovende veiligheidsprofielen zien. Door T-cellen uit te rusten met de Jchain-TCRs, observeerden we dat ze multiple myeloom cellen van verschillende patiënten doodmaakten, en alleen wanneer de *JCHAIN* tot expressie kwam. Bovendien verminderde Jchain-TCR T-cellen drastisch de tumorgroei in een preklinisch *in vivo* model van multiple myeloom. Deze TCRs hebben dus potentie voor verdere ontwikkeling als therapie voor patiënten met multipel myeloom. Gezien hun gunstige HLA-restricties zouden met de vier TCRs gezamenlijk ongeveer 60% van de patiënten met *JCHAIN*-positieve multipel myeloom behandeld kunnen worden.

In **Hoofdstuk 4** hebben we ons specifiek gericht op het identificeren van TCRs die kunnen worden toegepast als therapie voor patiënten met multipel myeloom. Multiple myeloomcellen zijn maligne plasmacellen en scheiden daarom vaak grote hoeveelheden immunoglobulinen van een bepaald isotype uit. De meeste patiënten hebben multipel myeloom van het IgG-isotype en 22% van de patiënten heeft het IgA-isotype. Multipel myeloompatiënten met IgA-expressie hebben een ongunstige prognose. We wilden daarom deze beide immunoglobulinen aanvallen via peptiden afkomstig van de constante delen van de IgG- en IgA-zware ketens. Volgens dezelfde aanpak als in Hoofdstuk 2 en Hoofdstuk 3 hebben we geprobeerd T-cellen te identificeren die specifiek zijn voor deze immunoglobulinen. Dit resulteerde in de ontdekking van T-celklonen specifiek voor het LMI-peptide uit het constante deel van de IgG gepresenteerd in HLA-A\*02:01, of de SPK- of HPR-peptiden uit het constante deel van IgA gepresenteerd in HLA-B\*07:02. Deze T-celklonen herkenden de multipel myeloomcellijnen en maakten ze dood wanneer de tumorcellen het juiste isotype tot expressie brachten. Specificiteit en functionaliteit bleven behouden na TCR-overdracht naar donor CD8 T-cellen. Immunoglobuline-TCR T-cellen herkenden geen gezonde cellen van zowel niet-hematopoietische als hematopoietische oorsprong, behalve B-cellen. Alleen de B-cellen die het specifieke isotype tot expressie brachten werden gedood, terwijl immunoglobuline-specifieke T-cellen andere B-cellen juist spaarden. Dit wijst op een potentieel klinisch voordeel door behoud van een gedeelte van de B-celimmunitet, vooral wanneer IgA-TCR T-cellen worden gebruikt. De immunoglobuline-TCR T-cellen waren daarnaast in staat om heel effectief multipel myeloomcellen op te ruimen uit het beenmergweefsel van patiënten wanneer het respectievelijke immunoglobuline en het doel-HLA-allel tot expressie kwamen. Bovendien verminderde IgA-TCR T-cellen effectief de tumorgroei in muizen met multipel myeloom.

In **Hoofdstuk 5** wordt een specifiek aspect van het HLA-klasse-I-ligandoom onderzocht, namelijk de aanwezigheid van onconventioneel lange peptiden. In de methode die we hebben toegepast in de hoofdstukken 2-4, evenals door anderen die werken aan de identificatie of voorspelling van T-cel-epitopen, is de algemene veronderstelling dat HLA-klasse-I korte peptiden van 8-11 aminozuren lang presenteert. Echter, het HLA-klasse-I-ligandoom bevat een aanzienlijk aantal langere peptiden die vaak worden afgedaan als contaminanten uit HLA-klasse-II. In hoofdstuk 5 werd een onconventioneel lang peptide onderzocht op zijn potentiële oorsprong uit HLA-klasse-I. We onderzochten een 20-aminozuur lang (20-mer) FLP-peptide van de IL27-receptor alfa, geïdentificeerd in HLA-A\*02:01-positieve cellen, en bestudeerden de binding ervan aan HLA-A\*02:01. Het succesvol vouwen van FLP:HLA-A\*02:01-complexen toonde aan dat het FLP-peptide inderdaad kon binden aan HLA-A\*02:01. Analyse van de kristalstructuur toonde aan dat de eerste 11 aminozuren op een conventionele lineaire manier aan HLA-A\*02:01 bonden, terwijl het overige gedeelte een 'peptidestaart' vormde die uit het HLA hing. We isoleerden T-cellen die het FLP-peptide herkenden, zoals beschreven in de eerdere hoofdstukken, om te begrijpen hoe zo'n lang peptide kon worden herkend. Onze bevindingen gaven aan dat terwijl sommige T-cellen werden geactiveerd door het kernpeptide alleen, andere de C-terminale staart nodig hadden en de herkenning verloren ging als deze werd afgeknipt of veranderd. Dit hoofdstuk benadrukt de diverse manieren waarop peptiden kunnen binden aan HLA en laat zien dat T-cellen peptiden gebonden aan HLA-klasse-I op onconventionele wijze kunnen herkennen.

Samenvattend hebben we in dit proefschrift elf nieuwe TCRs beschreven die veelbelovend zijn voor behandelingen van B-cel- en plasmacel-maligniteiten. Een groot deel van de TCRs, namelijk de BOB1, Jchain en immunoglobuline TCRs, herkent een doeleiwit dat tot expressie komt in multipel myeloom. Berekeningen waarbij we rekening houden met genexpressie- en HLA-allelfrequenties van de geïdentificeerde TCRs onthullen dat de in dit proefschrift geïdentificeerde TCRs gebruikt kunnen worden om ongeveer 67% van de patiënten met multipel myeloom te behandelen. Voor 28% van de patiënten zou meer dan één TCR beschikbaar zijn. Terwijl nog veel onderzoek nodig zal zijn om te bepalen of deze TCRs inderdaad waardevolle en veilige opties zijn voor behandeling, kunnen deze TCRs potentieel aanzienlijk bijdragen aan de beschikbaarheid van TCRs voor de behandeling van patiënten met multipel myeloom met TCR-gentherapie.