



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Quest for the cure: towards improving hematopoietic stem cell based lentiviral gene therapy

Tajer, S.P.

Citation

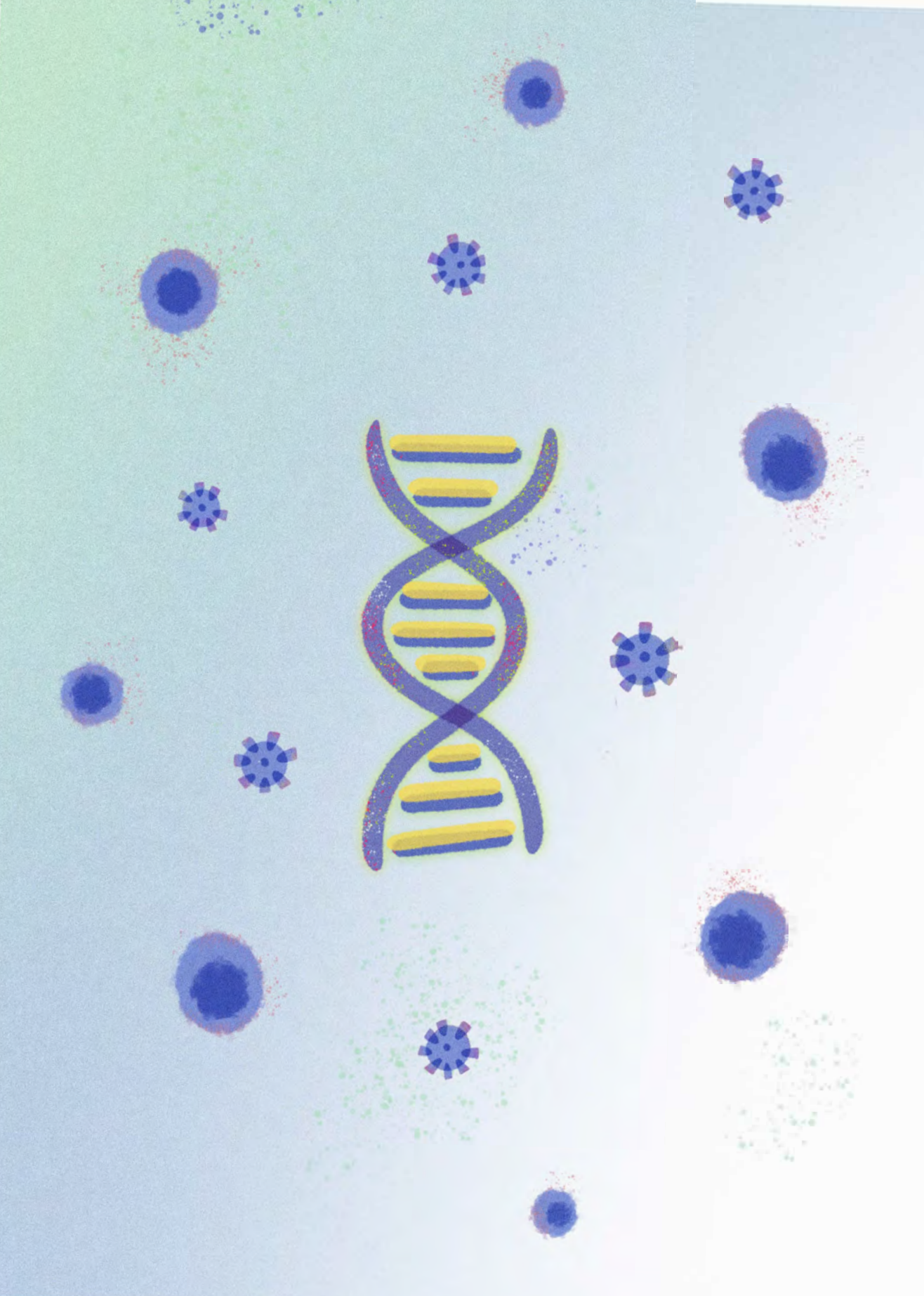
Tajer, S. P. (2024, December 17). *Quest for the cure: towards improving hematopoietic stem cell based lentiviral gene therapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4172518>

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/1887/4172518>

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



Appendix

Nederlands Samenvatting

Acknowledgements

Curriculum Vitae

List of Publications

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift streven we ernaar om verschillende belangrijke uitdagingen in hematopoëtische stamcel (HSC) gebaseerde gentherapie aan te pakken. Het doel van de in dit proefschrift beschreven studies was om op HSC gebaseerde lentivirale gentherapie te verbeteren om tot betere klinische resultaten te komen. HSC's hebben door hun therapeutische voordelen het veld van gentherapie getransformeerd. Autologe op HSC gebaseerde gentherapie, waarbij de eigen cellen van de patiënt genetisch worden gemodificeerd, biedt als voordeel minder immunologische barrières zoals graft-versus-hostziekte (GvHD), afstoting door de donor en beschikbaarheid van donoren in vergelijking met allogene transplantatie. Het huidige protocol van *ex vivo* autologe HSC-gentherapie is technisch uitdagend. HSC's zijn een zeldzame populatie in het beenmerg en kunnen worden verkregen via beenmergaspiratie of leukaferese uit perifere bloed na mobilisatie. Verrijkte HSC's worden genetisch gemanipuleerd *in vitro*. Tot voor kort bleef *ex vivo* behoud en expansie van echte HSC's en efficiënte genmanipulatie een uitdaging. Om onze kennis van HSC-biologie en hun *ex vivo* expansie uit te breiden, beschreven we een overzicht van de vooruitgang *ex vivo* expansieprotocollen in Hoofdstuk 2, dat de basis vormt voor onze studies in dit proefschrift.

Om te werken aan de optimalisatie van *in vitro* celcultuur in klinische omgevingen, hebben we in Hoofdstuk 3 de opname van Interleukine 3 (IL3) in het celcultuur protocol geadresseerd. Op basis van vroege bevindingen zijn combinaties van hematopoëtische cytokinen zoals Stamcel Factor (SCF), Flt3 ligand (FLT3), Trombopoëetine (TPO) en Interleukine 3 (IL3) vastgesteld als cruciale factoren voor het ondersteunen van HSC- en progenitorproliferatie en -onderhoud tijdens *in vitro* kweken, met name in klinische toepassingen. Echter, deze studies negeerden vaak de klinische implicaties van cytokinecombinaties op de expansie en engraftment van CD34+ progenitorcellen. In Hoofdstuk 3 hebben we het effect van IL3 beoordeeld op het behoud van het *in vivo* repopulerend vermogen van *ex vivo* geëxpandeerde menselijke CD34+ cellen uit navelstrengbloed. Primaire en secundaire transplantaties in NSG-muizen toonden aan dat de opname van IL3 in de *in vitro* kweekconditie het zelfvernieuwend en repopulerend vermogen van HSC's niet wist te behouden, wat wijst op het negatieve effect van IL3 op het onderhoud van LT-HSC's in celcultuur. Bovendien gaven gegevens van secundaire transplantaties aan dat IL3 een nadelig effect heeft op de langetermijnontwikkeling van de lymfoïde lijn (B-, T-, NK-cellen) in het beenmerg, perifere bloed, milt en thymus.

De opname van IL3 in een klinisch protocol voor de expansie van CD34⁺ voor gentherapie doeleinden resulteert in een toename van het totale aantal CD34⁺ cellen; de kwaliteit van LT-HSC's wordt echter minder ten gunste van de expansie van voorlopers die zich hebben toegewijd aan de myeloïde lijn. Deze observatie benadrukt ook de cruciale behoefte van een gedetailleerde identificatie van verschillende subsets in klinische toepassingen. Alleen vertrouwen op de frequentie en tellingen van CD34⁺ komt niet noodzakelijkerwijs overeen met de frequentie van functionele HSC's, die essentiële cellen zijn voor een beter resultaat van gentherapie.

In navolging van ons werk uit hoofdstuk 3 hebben we in Hoofdstuk 4 de verbetering van het expansieprotocol voor HSC's en de verbetering van de LV-transductie-efficiëntie onderzocht. Hematopoëse is een dynamisch proces waarbij zelfvernieuwing en differentiatie worden gecoördineerd via een netwerk van transcriptiefactoren, genen en signaalwegen. Epigenetische regulatie is een essentiële intrinsieke aanwijzing voor normale hematopoëse en celdifferentiebeslissingen onder fysiologische omstandigheden. Deze regulatie onderhoudt de HSC-pool door regulatie van essentiële transcriptiefactoren. Veranderingen in chromatintoegankelijkheid kunnen de genexpressie in hematopoëtische voorlopers veranderen en resulteren in een onevenwichtige volwassen output. Daarom onderzochten we in hoofdstuk 4 de impact van het opnemen van epigenetische regulatoren in het momenteel gebruikte protocol voor HSC-expansie voor LV-gebaseerde gentherapie.

We onderzochten de potentiële voordelen van Quisinostat, een experimenteel medicijn dat is ontworpen voor kankertherapie, en het eerder gepubliceerde kleine molecuul CPI203. Quisinostat en CPI203, of onderzochten Quisinostat, en beschreven CPI203. We hebben aangetoond dat zowel CPI203 als Quisinostat fenotypische HSC's in cultuur aanzienlijk verhogen, gevolgd door betere engraftment en reconstitutie van verschillende cellijnen. Interessant genoeg hebben we waargenomen dat de toevoeging van CPI203 en Quisinostat resulteert in een verbeterde ontwikkeling van lymfoïde en erytroïde cellijnen zonder andere cellijnen aan te tasten, een voordeel dat waardevol zou zijn voor patiënten met een verzwakt immuunsysteem en rode bloedcelstoornissen.

We hebben ook verder onderzoek gedaan naar het effect van Quisinostat en CPI203 in de context van LV-transductie. In Hoofdstuk 4 hebben we de efficiëntie van onze voorgestelde HSC-expansie kweekcondities met behulp van Quisinostat en CPI203 voor LV-gebaseerde gentherapie-instellingen beoordeeld. We hebben aangetoond dat de toevoeging van Quisinostat aan de celcultuur de LV-transductie-efficiëntie

significant verhoogde, niet alleen in totale cellen maar vooral in HSC's, vergeleken met andere kweekcondities.

Bovendien zagen we dat met Quisinostat geëxpandeerde cellen een verbeterde engraftment van getransduceerde cellen vertoonden in muizenstudies, wat zorgt voor langdurige correctie van HSC's. Dit zou ook de kosten in verband met virale vectoren moeten verminderen, aangezien er minder lentiviraal virus nodig zou zijn om een gewenst aantal vector kopieën te bereiken.

Ten slotte hebben we in Hoofdstuk 5 een nieuwe verpakkingscellijn ontwikkeld voor grootschalige productie van lentivirussen. LV-gebaseerde HSC-gentherapie is gepersonaliseerd en extreem kostbaar. De ontwikkeling van lentivirale vectoren en hun productie per ziekte dragen bij aan de hoge kosten van gentherapie. We hebben een stabiele verpakkingscellijn gegenereerd met behulp van het CRISPR-Cas9-platform, waarbij we belangrijke virale componenten integreerden in de menselijke Genomic Safe Harbours (GSH's) voor verbeterde stabiliteit en gecontroleerde integratie. GSH's zijn genomische locaties die de integratie van nieuw genetisch materiaal accommoderen, wat de functionele voorspelbaarheid en genomische stabiliteit waarborgt zonder een risico voor de gastheercel te vormen. Deze innovatieve benadering biedt veelbelovende mogelijkheden om de huidige beperkingen in grootschalige LV-productie aan te pakken, en daarmee het veld van gentherapie vooruit te helpen.

Samenvattend presenteert dit proefschrift belangrijke vooruitgangen in het veld van HSC-gebaseerde gentherapie door de aanpak van belangrijke uitdagingen met betrekking tot HSC-expansie, lentivirale transductie-efficiëntie en grootschalige productie van lentivirale vectoren. De bevindingen benadrukken het belang van het optimaliseren van *in vitro* kweekomstandigheden, zoals aangetoond door de nadelige effecten van IL3 op het langdurig onderhoud van HSC's, en het potentieel van epigenetische regulatoren zoals CPI203 en Quisinostat om zowel HSC-expansie als transductie-efficiëntie te verbeteren. Bovendien vertegenwoordigt de ontwikkeling van een nieuwe verpakkingscellijn voor grootschalige lentivirale productie een veelbelovende stap in de richting van het verlagen van de kosten en het vergroten van de toegankelijkheid van gentherapie. Gezamenlijk bieden deze bijdragen waardevolle inzichten en praktische oplossingen die de klinische resultaten van HSC-gebaseerde gentherapieën aanzienlijk kunnen verbeteren, en ons dichterbij brengen bij het realiseren van hun volledige therapeutische potentieel.