

Appendices

Nederlandse samenvatting

PhD portfolio

List of publications

Curriculum vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Publieke neoantigenen voor immuuntherapie tegen acute myeloïde leukemie

T-cellen zijn specifieke immuuncellen

T-cellen zijn immuuncellen die essentieel zijn voor de afweer tegen ziekteverwekkers. Ziekteverwekkers produceren lichaamsvreemde peptiden, kleine eiwitfragmenten, die op het celoppervlak kunnen worden gepresenteerd door humane leukocyten antigenen (HLA). Deze HLA-gebonden peptiden kunnen vervolgens worden herkend door T-cellen via hun specifieke T-celreceptor (TCR). Een HLA-gebonden peptide dat door een T-cel wordt herkend, heet een antigeen. Wanneer een T-cel zijn doelwitantigeen herkent, kan de T-cel worden geactiveerd om zijn functies uit te voeren. T-cellen worden onderverdeeld in CD8 en CD4 T-cellen. De primaire functie van CD8 T-cellen is het direct vernietigen van cellen. Sommige CD4 T-cellen kunnen dit ook, maar de meeste fungeren als helpercellen die andere immuuncellen ondersteunen en zo de immuunrespons bevorderen. CD8 en CD4 T-cellen herkennen peptiden die door verschillende HLA-moleculen worden gepresenteerd. HLA-klasse-I-moleculen zijn aanwezig op bijna alle lichaamscellen en presenteren peptiden van intracellulaire eiwitten aan CD8 T-cellen. HLA-klasse-II-moleculen komen vooral voor op antigeen-presenterende cellen (APC's) en presenteren met name peptiden van extracellulaire of membraangebonden eiwitten aan CD4 T-cellen, alhoewel ook intracellulaire peptiden kunnen worden gepresenteerd. Er zijn drie soorten HLA-klasse-I-moleculen (HLA-A, HLA-B en HLA-C) en drie soorten HLA-klasse-II-moleculen (HLA-DR, HLA-DP en HLA-DQ). Van elke soort bestaan vele varianten met elk een eigen verdeling in de bevolking. Iedere HLA-variant kan een groot repertoire aan peptiden binden. Elke T-cel heeft een unieke TCR die specifiek is voor één of enkele peptide:HLA-complexen. Ieder individu bezit zo een omvangrijk T-celrepertoire met miljoenen verschillende TCR's.

Tumorcellen kunnen neoantigenen produceren

Een belangrijke oorzaak voor het ontstaan van tumoren is de ophoping van mutaties in het DNA. Deze tumor-specifieke mutaties kunnen neoantigenen produceren: afwijkende peptiden die door HLA-moleculen op tumorcellen worden gepresenteerd en door T-cellen worden herkend. Omdat neoantigenen worden gecodeerd door mutaties die afwezig zijn in gezonde cellen, zijn neoantigenen aantrekkelijke doelwitten voor T-cel immuuntherapieën. Tumoren kunnen echter ontsnappen aan T-celimmunitet door mutaties die voor neoantigenen coderen te verliezen. Sommige mutaties, zogenaamde driver-mutaties, zijn essentieel voor het voortbestaan van de tumor en kunnen daarom niet makkelijk worden kwijtgeraakt. Voor het ontstaan van neoantigenen moeten mutaties aanwezig zijn in genen die tot expressie komen. De



afwijkende eiwitten dienen in de cel afgebroken te worden tot gemuteerde peptiden, die vervolgens moeten binden aan de HLA-moleculen van de patiënt om op het celoppervlak te worden gepresenteerd. Tenslotte moeten deze HLA-gebonden neopeptiden worden herkend door T-cellen. Vaak wordt niet aan al deze voorwaarden voldaan, waardoor de meeste mutaties geen neoantigenen genereren. De kans op neoantigeen vorming is afhankelijk van het aantal aanwezige mutaties en neemt toe met het aantal mutaties in een tumor. Het is lastig te voorspellen welke mutaties uiteindelijk neoantigenen zullen creëren. Dit bemoeilijkt het identificeren van neoantigenen. De meeste identificatie strategieën starten met het bepalen van mutaties in het tumorweefsel van de patiënt, wat vaak een groot aantal mutaties oplevert. Dit aantal kan worden gefilterd met online predictietools die voorspellen of de neopeptiden die door deze mutaties worden gecodeerd, voldoen aan de voorwaarden voor neoantigeen vorming. De geselecteerde neopeptiden moeten vervolgens worden gevalideerd als neoantigenen, wat inhoudt dat moet worden aangetoond dat zij op tumorcellen worden gepresenteerd en door T-cellen worden herkend.

Minor histocompatibiliteitsantigenen (MiHA's)

Net zoals neoantigenen zijn MiHA's peptiden die ontstaan door variaties in het DNA en die worden herkend door T-cellen. MiHA's kunnen door T-cellen worden herkend na allogene stamceltransplantatie (alloSCT), een mogelijk genezende behandeling voor patiënten met bloedkanker. Voorafgaand aan alloSCT wordt de patiënt behandeld met chemotherapie, eventueel gecombineerd met radiotherapie, om het zieke bloedvormende systeem te vernietigen. Vervolgens ontvangt de patiënt stamcellen van een donor die uitgroeien tot een nieuw, gezond bloedvormend systeem. Na een succesvolle alloSCT is het bloedvormende systeem in de patiënt dus van donor oorsprong, oftewel allogeen. Donor T-cellen kunnen na alloSCT zowel tumorcellen als gezonde cellen van de patiënt aanvallen. Wanneer patiënt en donor identieke HLA-moleculen hebben, kunnen afweerreacties worden veroorzaakt door donor T-cellen die MiHA's herkennen op cellen van de patiënt. MiHA's ontstaan door natuurlijk voorkomende genetische variaties tussen patiënt en donor, waardoor peptiden ontstaan die tussen beiden verschillen. Het peptide dat op cellen van de patiënt wordt gepresenteerd en herkend, wordt een MiHA genoemd. Het corresponderende peptide in de donor is de allelische variant.

Publieke neoantigenen als doelwit op acute myeloïde leukemie (AML)

AML is een type bloedkanker waarbij de myeloïde cellen zijn aangedaan. De behandeling is gericht op het vernietigen van deze kwaadaardige cellen en het verkleinen van de kans op terugkeer van de ziekte. AML is echter een agressieve aandoening en, ondanks intensieve therapie, krijgt een aanzienlijk deel van de patiënten een recidief. De behandeling van recidief AML is lastig en het ziektebeloop

is doorgaans ongunstig. Nieuwe, effectieve behandelstrategieën zijn daarom dringend nodig. T-cel immuuntherapie gericht tegen neoantigenen is een veelbelovende optie. In AML komen relatief weinig mutaties voor, waardoor de kans op neoantigeen vorming klein is. De meeste patiënten hebben echter tenminste één driver-mutatie, en deze mutaties zijn vaak identiek tussen patiënten. Veelvoorkomende mutaties kunnen daardoor publieke neoantigenen creëren, wat AML geschikt maakt voor TCR-T-celtherapie waarbij één of enkele publieke neoantigenen worden aangevallen. Bij deze therapie worden T-cellen uit het bloed van de patiënt verzameld en buiten het lichaam uitgerust met een tumor-specifieke TCR. Deze TCR-T-cellen worden vervolgens vermeerderd en teruggegeven aan de patiënt, zodat zij tumorcellen kunnen opsporen en elimineren. Door genetische modificatie kunnen grote aantallen TCR-T-cellen worden geproduceerd die zich specifiek richten tegen zorgvuldig geselecteerde neoantigenen. Bovendien kunnen de T-cellen worden voorzien van TCR's die uitvoerig zijn getest op effectiviteit en veiligheid.

Dit proefschrift

TCR-T-celtherapie gericht tegen publieke neoantigenen die worden gecodeerd door driver-mutaties in AML, kan bij meerdere patiënten worden toegepast en heeft een relatief laag risico op ontsnapping van AML-cellen door verlies van neoantigeen-coderende mutaties. Het onderzoek in dit proefschrift richtte zich op het identificeren van publieke neoantigenen afkomstig van veelvoorkomende driver-mutaties in AML die worden gepresenteerd door HLA-klasse-I- of HLA-klasse-II-moleculen. Daarnaast zijn TCR's geïsoleerd die gericht zijn tegen deze neoantigenen en kunnen worden ingezet voor TCR-T-celtherapie.

Om efficiënt neoantigenen te identificeren, worden neopeptiden vaak gefilterd met online predictietools. Deze tools verschillen in hun vermogen om het aantal fout-positieve neopeptiden te verminderen, terwijl daadwerkelijke neoantigenen behouden blijven. In **hoofdstuk 2** onderzochten we diverse predictietools op hun vermogen om T-celantigenen te identificeren. Deze predictietools voorspelden verschillende biologische kenmerken die van belang zijn voor antigeen vorming, zoals de efficiëntie waarmee het peptide in de cel wordt geproduceerd en het vermogen om te binden aan HLA-klasse-I-moleculen. We voorspelden deze kenmerken voor 68 HLA-klasse-I-bindende MiHA's. Deze waren in eerdere onderzoeken geïdentificeerd als T-celantigenen en voldeden dus per definitie aan de voorwaarden voor antigeen vorming. Om het voorspellend vermogen van de tools te beoordelen, stelden we ook een referentiegroep samen van peptiden met voorspelde binding aan HLA-A*02:01 of HLA-B*07:02 die niet waren geïdentificeerd als T-celantigenen. We vergeleken de voorspelde kenmerken tussen de MiHA's en de referentiegroep, en concludeerden dat alleen de tool die HLA-binding voorspelt

substantieel bijdraagt aan de karakterisering van MiHA's. Met deze tool werd 87% van de MiHA's correct voorspeld te binden aan HLA, vaak met sterke binding. Daarnaast vergeleken we de voorspelde kenmerken tussen MiHA's en hun allelische varianten, en vonden dat deze vaak vergelijkbaar waren. Dit suggereert dat allelische varianten mogelijk ook kunnen worden geproduceerd in de cel, gepresenteerd in HLA en herkend door T-cellen.

Onder de meest voorkomende driver-mutaties in AML vallen mutaties in het *NPM1* gen, die aanwezig zijn in 30-35% van de volwassen patiënten. Door deze mutaties, waarbij 4 nieuwe basenparen worden ingebouwd, ontstaat een gemuteerd eiwit met een afwijkende aminozuurvolgorde. Ten opzichte van het normale eiwit is het gemuteerde NPM1 eiwit 4 aminozuren langer en zijn de laatste 11 aminozuren afwijkend. Deze afwijkende aminozuren kunnen mogelijk neoantigenen creëren. Omdat deze worden gecodeerd door een veelvoorkomende driver-mutatie die essentieel is voor de ontwikkeling en het voortbestaan van AML, vormen zij aantrekkelijke doelwitten voor T-cel immuuntherapie. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de identificatie van een HLA-klasse-I-bindend publiek neoantigeen afkomstig van gemuteerd NPM1. We onderzochten eerst of NPM1 neopeptiden worden gepresenteerd in HLA-klasse-I-moleculen op AML-cellen. Hiervoor isoleerden we peptide:HLA-complexen van het celoppervlak van 12 AML-monsters, scheidden de peptiden van de HLA-moleculen en bepaalden hun aminozuurvolgorde met massaspectrometrie. We detecteerden 5 verschillende NPM1 neopeptiden op *NPM1*-gemuteerde AML, wat bevestigt dat het afwijkende eiwit in de cel wordt afgebroken tot neopeptiden die daarna in HLA worden gepresenteerd op AML. Om deze neopeptiden te valideren als neoantigenen, moet herkenning door T-cellen worden aangetoond. Voor één van de 5 neopeptiden, het peptide CLAVEEVSL dat bindt aan de veelvoorkomende HLA-klasse-I-variant HLA-A*02:01, zochten we naar specifieke CD8 T-cellen met peptide:HLA-klasse-I-tetrameren. Hiermee kunnen antigeen-specifieke T-cellen worden geïsoleerd. In HLA-A*02:01-positieve patiënten met *NPM1*-gemuteerde AML vonden we geen CLAVEEVSL-specifieke CD8 T-cellen. Daarom onderzochten we HLA-A*02:01-positieve gezonde individuen en isoleerden meerdere tetrameer-positieve CD8 T-celklonen. Twee hiervan herkenden *NPM1*-gemuteerde AML-cellen. Voor de T-celkloon met de sterkste reactiviteit bepaalden we de DNA-sequentie van de TCR, kloonden deze en introduceerden de TCR in CD8 en CD4 T-cellen van HLA-A*02:01-positieve gezonde individuen. Zowel CD8 als CD4 T-cellen met deze NPM1-A2-specifieke TCR konden *NPM1*-gemuteerde AML-cellen herkennen en doden, terwijl zij AML-cellen met het normale NPM1 eiwit spaarden. Bovendien remden NPM1-A2-specifieke TCR-T-cellen de groei van een *NPM1*-gemuteerde AML-cellijn in muizen, wat leidde tot een betere overleving. Deze resultaten tonen aan dat CLAVEEVSL een publiek neoantigeen is dat wordt gepresenteerd door HLA-A*02:01 op *NPM1*-gemuteerde AML, en dat de

NPM1-A2-specifieke TCR kan worden ingezet voor TCR-T-celtherapie om patiënten met *NPM1*-gemuteerde AML te behandelen.

Het aantal patiënten met *NPM1*-gemuteerde AML dat kan worden behandeld met T-cel immuuntherapie, kan worden uitgebreid door *NPM1* neoantigenen in verschillende HLA-varianten te identificeren. In **hoofdstuk 4** onderzochten we daarom of AVEEVSLRK ook een neoantigeen is op AML. Dit peptide werd, net als CLAVEEVSL, met massaspectrometrie gedetecteerd op *NPM1*-gemuteerde AML. Een online predictietool voorspelde binding van AVEEVSLRK aan de HLA-klasse-I-varianten HLA-A*03:01 en HLA-A*11:01, wat we bevestigden met een peptide:HLA-klasse-I-bindingstest. Met tetrameren zochten we naar AVEEVSLRK-specifieke CD8 T-cellen in HLA-A*03:01- of HLA-A*11:01-positieve gezonde individuen. We isoleerden drie T-celklonen die het peptide in HLA-A*11:01 herkenden, waarvan één kloon ook *NPM1*-gemuteerde AML-cellen kon herkennen. De DNA-sequentie van de TCR van deze kloon werd bepaald, waarna de TCR werd geïntroduceerd in CD8 en CD4 T-cellen van HLA-A*11:01-positieve gezonde individuen. Alleen CD8 T-cellen met de *NPM1*-A11-specifieke TCR waren in staat *NPM1*-gemuteerde AML-cellen te herkennen en te vernietigen. Deze T-cellen slaagden er echter niet in de groei van een *NPM1*-gemuteerde AML-cellijn in muizen te remmen. Deze resultaten tonen aan dat AVEEVSLRK een publiek HLA-A*11:01-bindend neoantigeen is op *NPM1*-gemuteerde AML. Er is echter aanvullend onderzoek nodig om te bepalen of de *NPM1*-A11-specifieke TCR geschikt is voor toepassing in TCR-T-celtherapie voor patiënten met AML.

CD4 T-cellen zijn vaak cruciaal als helpercellen voor een efficiënte anti-tumor immuunrespons. Daarnaast kunnen zij in sommige gevallen HLA-klasse-II-positieve tumorcellen direct doden. AML-cellen brengen vaak HLA-klasse-II-moleculen tot expressie. In **hoofdstuk 5** richtten we ons daarom op het identificeren van neoantigenen die worden gepresenteerd door HLA-klasse-II-moleculen. Met behulp van een publieke database waarin mutaties in verschillende kankersoorten zijn gecatalogiseerd, selecteerden we 26 mutaties die vaak voorkomen in AML. Met een online predictietool onderzochten we of deze mutaties coderen voor neopeptiden met voorspelde binding aan frequent voorkomende HLA-klasse-II-varianten. Dit leidde tot de selectie en synthese van 24 lange neopeptiden afkomstig van 10 mutaties. Hieronder vielen 8 overlappende neopeptiden van het gemuteerde *NPM1* eiwit die onafhankelijk van voorspelde HLA-binding waren geselecteerd. De synthetische peptiden werden van buitenaf beladen op HLA-klasse-II-positieve dendritische cellen, een bekend type APC, om CD4 T-cellen van gezonde individuen te stimuleren. Na stimulatie isoleerden we meerdere CD4 T-celklonen die neopeptiden afkomstig van verschillende mutaties herkenden wanneer deze waren beladen op HLA-klasse-II-positieve cellen. Voor twee neopeptiden, gecodeerd door

mutaties in *DNMT3A* en *RUNX1*, werden CD4 T-celklonen geïsoleerd die cellijnen herkenden waarin zowel de mutatie als de relevante HLA-klasse-II-varianten waren geïntroduceerd. Dit toont aan dat deze neopeptiden in de cel worden geproduceerd en in HLA-klasse-II-moleculen op het celoppervlak worden gepresenteerd. Het DNMT3A neopeptide, afkomstig van een driver-mutatie die voorkomt in circa 10% van de volwassen patiënten met AML en leidt tot één enkele aminozuur verandering, werd ook herkend door een CD4 T-celkloon op AML-cellen waarin zowel de mutatie als de relevante HLA-DQB1*06:02- of HLA-DQB1*06:03-moleculen natuurlijk aanwezig waren. Hoewel deze CD4 T-celkloon AML-cellen kon herkennen, was hij niet in staat de tumorcellen direct te doden. We concludeerden dat de driver-mutatie in *DNMT3A* een publiek HLA-klasse-II-bindend neoantigeen op AML voortbrengt dat een relevant doelwit zou kunnen vormen voor CD4 T-cel immuuntherapie.

In dit proefschrift worden drie publieke neoantigenen geïdentificeerd die worden gecodeerd door veelvoorkomende driver-mutaties in het *NPM1* of *DNMT3A* gen en worden gepresenteerd door frequente HLA-klasse-I- of HLA-klasse-II-varianten op AML. Deze neoantigenen kunnen mogelijk dienen als doelwitten voor immuuntherapieën waarin neoantigeen-specifieke CD8 of CD4 T-cellen, of een combinatie daarvan, worden ingezet. Onze geïsoleerde NPM1-A2-specifieke TCR tegen het NPM1 neoantigeen CLAVEEVSL in HLA-A*02:01 is bovendien geschikt voor TCR-T-celtherapie. Immuuntherapieën gericht tegen publieke neoantigenen kunnen in de toekomst mogelijk worden ingezet als therapie voor patiënten met AML om recidief van de ziekte te behandelen of zelfs te voorkomen.