

DISS. ETH NO. 28036

***Molecular and Cellular Engineering of T cell  
Immunotherapies***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

***EDO KAPETANOVIC***

*Medical doctor (MD), University of Rijeka*

born on 26.07.1990

citizen of *Croatia*

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Sai T. Reddy, examiner*

*Prof. Dr. Ed Palmer, co-examiner*

*Prof. Dr. Heinz Läubli, co-examiner*

## ABSTRACT

Immunotherapy is an exciting new field of cancer therapy that goes beyond the standard anticancer arsenal consisting of surgery, chemotherapy and radiotherapy. Numerous advancements in this field have opened up new therapeutic strategies and continue to tackle the unmet medical need.

The thesis will start by describing the issues associated with cancer immunology. Mainly, the role of inflammation in tumor development, how tumors affect distant tissues and the importance of a holistic approach in understanding tumor biology will be discussed. Next, the thesis will explain the concept of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and checkpoint inhibitors.

In the following passage, the effect of MHC downregulation on T cell recognition will be discussed, including the development of novel, MHC independent therapies, such as CAR T cells and bispecific antibodies. The thesis will then explore allogeneic T cells and TCR-CD3 complex assembly and signaling.

In the following chapter, a strategy to engineer allogeneic T cells that can be safely combined with bispecific antibodies will be introduced. Specifically, the screening for a conserved motif and the criteria required to successfully decouple TCR-antigen- binding from CD3-signaling will be described. Furthermore, the proposed engineering method and its effect on the signaling capacity of decoupled TCRs in response to cognate peptides, and blinatumomab, a clinically approved bispecific antibody, will be examined in detail. Building on this, the library design and functional screening assays will be analyzed and signaling properties of multiple engineered receptors, across four different TCRs, will be reported.

The thesis will present the experiments conducted with decoupled primary human T cells. The *in vitro* data, with several donors, showed abrogated capacity of decoupled T cells to recognize and target cognate peptides, and a complete anti-tumor response when activated with blinatumomab. Finally, the *in vivo* results demonstrated that primary human T cells

with decoupled TCRs do not cause a GvHD in mouse xenograft models, and could be safely used in combination with bispecific antibodies.

Taken together, this thesis gives an overview of cancer immunotherapy and describes a novel therapeutic approach that combines CD3 agonists with allogeneic T cells. These findings have the potential to deepen the understanding of TCR-CD3 biology and, the proposed combination therapy will, hopefully, have a clinical application in the near future.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Immuntherapie ist ein aufregender neuer Bereich der Krebstherapie, der über das Standard-Arsenal der Krebsbekämpfung, bestehend aus Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie, hinausgeht. Zahlreiche Fortschritte auf diesem Gebiet haben neue therapeutische Strategien eröffnet und tragen dazu bei, den ungedeckten medizinischen Bedarf zu decken.

In dieser Arbeit werden zunächst die mit der Krebsimmunologie verbundenen Probleme beschrieben. Dabei geht es vor allem um die Rolle von Entzündungen bei der Tumorentwicklung, um die Auswirkungen von Tumoren auf entfernte Gewebe und um die Bedeutung eines ganzheitlichen Ansatzes für das Verständnis der Tumorbiologie. Anschließend wird das Konzept der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) und der Checkpoint-Inhibitoren erläutert.

Im darauffolgenden Abschnitt werden die Auswirkungen der MHC-Downregulation auf die T-Zell-Erkennung erörtert, einschließlich der Entwicklung neuartiger, MHC-unabhängiger Therapien, wie CAR-T-Zellen und bispezifische Antikörper. Anschließend werden allogene T-Zellen und der Aufbau des TCR-CD3-Komplexes sowie die Signalübertragung untersucht.

Im folgenden Kapitel wird eine Strategie zur Entwicklung allogener T-Zellen vorgestellt, die sicher mit bispezifischen Antikörpern kombiniert werden können. Insbesondere werden die Suche nach einem konservierten Motiv und die Kriterien beschrieben, die für eine erfolgreiche Entkopplung der TCR-Antigen-Bindung von der CD3-Signalisierung erforderlich sind. Darüber hinaus werden die vorgeschlagene Engineering-Methode und ihre Auswirkungen auf die Signalkapazität der entkoppelten TCRs als Reaktion auf kognitive Peptide und Blinatumomab, ein klinisch zugelassener bispezifischer Antikörper, im Detail untersucht. Darauf aufbauend werden das Bibliotheksdesign und funktionelle Screening-Assays analysiert und die Signaleigenschaften mehrerer gentechnisch veränderter Rezeptoren aus vier verschiedenen TCRs beschrieben.

In der Dissertation werden die mit entkoppelten primären menschlichen T-Zellen durchgeführten Experimente vorgestellt. Die In-vitro-Daten mit mehreren Spendern zeigten, dass die entkoppelten T-Zellen nicht mehr in der Lage sind, kognitive Peptide zu erkennen und zu binden, und dass sie bei Aktivierung mit Blinatumomab eine vollständige Anti-Tumor-Antwort zeigen. Schließlich zeigten die In-vivo-Ergebnisse, dass primäre humane T-Zellen mit entkoppelten TCRs in Maus-Xenograft-Modellen keine GvHD verursachen und sicher in Kombination mit bispezifischen Antikörpern eingesetzt werden können.

Insgesamt gibt diese Arbeit einen Überblick über die Krebsimmuntherapie und beschreibt einen neuen therapeutischen Ansatz, der CD3-Agonisten mit allogenen T-Zellen kombiniert. Wir gehen davon aus, dass diese Erkenntnisse das Verständnis der TCR-CD3-Biologie vertiefen werden, und wir hoffen, dass die vorgeschlagene Kombinationstherapie in naher Zukunft klinisch angewendet werden kann.