



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Allogeneic cellular immunotherapy for chronic B-cell leukemia

Hoogendoorn, M.

Citation

Hoogendoorn, M. (2007, February 15). *Allogeneic cellular immunotherapy for chronic B-cell leukemia*. Department of Hematology, Faculty of Medicine, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11408>

Version: Corrected 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/1887/11408>

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

Chapter

7

Nederlandse Samenvatting

Chronische B-cel leukemie

In het beenmerg bevinden zich hematopoïetische stamcellen die de continue aanmaak van bloed- en afweercellen, ook wel hematopoïese, verzorgen. Bij maligne ontaarding van de hematopoïetische stamcel kan de diagnose leukemie gesteld worden. Afhankelijk van de ontwikkelingsrichting, het ontwikkelingsstadium, waarin de maligne cel zich bevindt en de snelheid van deling van de kwaadaardige cel, kan leukemie verder geclassificeerd worden. Bij acute leukemie is er meestal sprake van een snelle proliferatie van de leukemiecellen in bloed en beenmerg met daarbij verdringing van de normale hematopoïese. Chronische vormen van leukemie, zoals chronische myeloïde leukemie (CML) en chronische lymfatische leukemie (CLL) kunnen zich in eerste instantie indolent gedragen. Dit proefschrift gaat over chronische leukemie waarbij de maligne kloon ontstaan is uit de rijpere B-cel lymfocyt.

Chronische lymfatische leukemie

Chronische lymfatische leukemie (CLL) is de meest voorkomende leukemie bij volwassenen en komt voornamelijk op oudere leeftijd voor. Deze chronische ziekte wordt gekarakteriseerd door klonale proliferatie en opeenhoping van maligne B-cellen in bloed, beenmerg en lymfeklieren. Dit kan leiden tot lymfadenopathie, splenomegalie, cytopenieën en een verhoogde gevoeligheid voor infecties. De ziekte gedraagt zich heterogeen. Een groot percentage van de patiënten met CLL is en blijft asymptomatisch, behoeft geen behandeling en heeft een goede prognose. In tegenstelling tot patiënten die bij presentatie symptomatisch zijn. Zij hebben ondanks behandeling met chemotherapie een snel progressieve ziekte. Met behulp van nieuwe moleculaire en cytogenetische technieken is het momenteel mogelijk om bij het stellen van de diagnose een inschatting te maken ten aanzien van de agressiviteit van de ziekte.

Ondanks dat het beschikbaar therapeutische arsenaal tegen CLL is uitgebreid met zeer effectieve chemotherapie en monoklonale antistof therapie, heeft dit in deze patiëntencategorie nog niet geleid tot genezing van de ziekte. Een nieuwe veelbelovende behandelmodaliteit die mogelijk kan leiden tot curatie van de CLL is een stamceltransplantatie (SCT) met stamcellen afkomstig van een gezonde donor (allogene SCT).

Mantel cel lymfoom

Mantel cel lymfoom (MCL) is een agressieve en ongewone vorm van non-Hodgkin lymfoom (NHL), die vooral optreedt bij mannen van middelbare leeftijd. Door een chromosomale translocatie (t(11;14)) van een B-cel die zich in de mantel van de lymfklier bevindt, ontstaat een sterk toegenomen celproliferatie met als eindresultaat een maligne ontaarding. Bij diagnose is er meestal sprake van uitgebreide ziekte met gegeneraliseerde lymfadenopathie. Veelvuldig is de ziekte leukemisch met uitgebreide accumulatie van maligne mantelcellen in bloed en beenmerg. De ziekte reageert initieel vrijwel altijd goed op agressieve chemotherapie. De ziekte keert echter bij vrijwel iedereen terug, met het

overlijden van de patiënt als resultaat. Om de overleving te verbeteren wordt nu bij de conventionele chemokuren specifieke monoklonale antistoftherapie in de vorm van rituximab gegeven. Als consolidatie behandeling wordt vervolgens een hoge dosis chemotherapie gegeven gevolgd door een autologe SCT. Deze intensieve therapie heeft geleid tot betere ziekte-vrije overleving, maar niet tot genezing. Allogene SCT wordt momenteel onderzocht als curatieve behandelingsoptie voor patiënten met MCL.

Cellulaire immunoreacties tegen CLL en MCL

Ondanks het feit dat CLL en MCL cellen rond circuleren in het bloed en voortdurend in contact zouden moeten komen met T cellen vindt er kennelijk geen adequate immunoreactie plaats en ontsnappen zij aan de specifieke afweer. Het ontbreken van een efficiënte T cel respons zou verklaard kunnen worden door het feit dat CLL en MCL cellen niet goed functioneren als antigeen presenterende cellen (APC). Zij ontberen expressie van costimulatoire moleculen op hun celoppervlak die noodzakelijk zijn voor T cel activatie. Verder worden ook geen relevante immunoresponsen tegen tumor-specifieke antigenen geobserveerd ondanks de aanwezigheid van die antigenen op de CLL cel. Aangezien in autologe setting immunotherapie tegen CLL en MCL niet succesvol is, kan het aantrekkelijk zijn om een compleet nieuw T cel repertoire te introduceren door middel van een allogene SCT.

Allogene stamceltransplantatie

Bij allogene SCT wordt de hematopoïese van de patiënt vervangen door donor hematopoïese. Om allogene donor stamcellen te laten prolifereren in de patiënt en om afstoting van het transplantaat te voorkomen dienen de T cellen van de patiënt op het moment van transplantatie geëradiceerd te worden middels een vorm van myeloablatieve behandeling met chemotherapie en/of totale lichaamsbestraling. Hoewel deze conditionering van de patiënt voor allogene SCT zeker een leukemie reducerend effect heeft, worden de immunoreacties die optreden na de allogene transplantaties, beschouwd als de belangrijkste oorzaak voor het curatieve effect van een allogene SCT. Indien in het stamceltransplantaat naast stamcellen ook donor T cellen aanwezig zijn, kunnen deze donor T cellen weefsels van de patiënt als lichaamsvreemd beschouwen en aanvallen. Deze immunoreactie kan ernstige schade geven aan huid en organen en staat bekend als graft-versus-host disease (GvHD). GvHD kan grotendeels voorkomen worden door de T cellen uit het transplantaat te halen (T cel depletie) voorafgaand aan de toediening. T cel gedepleteerde allogene SCT leidt echter tot een grotere kans op terugkeer van de leukemie. De T cellen in het transplantaat zijn dus blijkbaar in staat ook de leukemiecellen te herkennen die na de chemotherapie en bestraling nog aanwezig kunnen zijn. Deze gunstige reactiviteit van donor T cellen tegen leukemiecellen wordt graft-versus-leukemia (GvL) reactiviteit genoemd, en is waarschijnlijk het belangrijkste mechanisme voor het curatieve effect van een allogene SCT.

Cellulaire immunotherapie na allogene stamceltransplantatie

Veel onderzoek vindt plaats om enerzijds de toxiciteit en morbiditeit van GvHD na transplantatie te beperken en anderzijds de GvL-activiteit te behouden of verder te maximaliseren. Veel

transplantatie centra gebruiken protocollen waarbij donor T cellen bij het transplantaat worden toegediend teneinde optimale GvL-activiteit te verkrijgen met als prijs veel GvHD die vervolgens onderdrukt wordt met krachtige afweeronderdrukkende medicatie. Een alternatieve benadering bestaat uit het toedienen van een T cel gedepleteerd transplantaat na voorbehandeling van de patiënt waarbij de nadruk ligt op het vestigen van donor hematopoïese in de patiënt. Vervolgens kunnen rechtstreeks van de donor verkregen T cellen worden toegediend om de leukemiecellen te vernietigen. Deze vorm van cellulaire immunotherapie met allogene SCT als platform staat bekend als donor lymfocyten infusie (DLI). Na DLI kan echter ook GvHD optreden door alloreactiviteit van ongeseeldeerde donor T cellen. Het selecteren en infunderen van donor T cellen die in staat zijn met name de leukemiecellen te herkennen en niet de normale weefsels van de patiënt, zou kunnen leiden tot optimale GvL-activiteit zonder het optreden van GvHD.

De immuunreactiviteit na allogene SCT kan worden veroorzaakt door de aanwezigheid van verschillen in HLA moleculen tussen donor en patiënt. Aangezien er een duidelijke correlatie tussen de immuunreacties en de mate van HLA verschillen tussen donor en patiënt is, wordt er bij allogene SCT naar gestreefd een HLA-identieke donor te vinden. Desondanks kunnen na HLA-identieke allogene SCT immuunreacties optreden tussen donor en patiënt. Dit wordt veroorzaakt door donor T cellen die minor histocompatibility antigenen (mHag), gebonden aan HLA moleculen, van de patiënt herkennen. Bij een HLA-identieke SCT kunnen de immunogene mHag dus verschillend tot expressie komen zowel als in patiënt en donor. De wefseldistributie en expressie van de mHag waartegen de T cel reactie is gericht, kan variëren. Sommige mHag komen op vrijwel alle cellen tot expressie. Een donor T-cel respons hiertegen zal dus zowel GvHD als GvL-activiteit kunnen induceren. Een ander type mHag komt alleen tot expressie op hematopoïetische cellen inclusief leukemiecellen. Indien dit antigeen het doelwit is van de donor T cel kan dit leiden tot een GvL respons zonder het optreden van GvHD. Er is recent een mHag geïdentificeerd die selectief tot expressie komt op de normale en maligne B cel. Dit zou dus een aantrekkelijk doelwit kunnen zijn voor immunotherapie na allogene SCT.

Allogene stamceltransplantatie in patiënten met CLL of MCL

Patiënten met CLL of MCL die niet meer reageren op chemotherapie al dan niet in combinatie met monoklonale antistof therapie hebben een slechte prognose en zouden in aanmerking kunnen komen voor een allogene SC. De kans op terugkeer van ziekte na allogene SCT is kleiner dan na een autologe SCT en langdurige follow-up heeft laten zien dat er kans is op genezing. Dit betekent dus dat de CLL en MCL cellen target kunnen zijn van GvL-activiteit. Allogene SCT met standaard myeloablatieve conditionering middels totale lichaamsbestraling en hoge dosis chemotherapie leidt echter in deze oudere patiëntengroep tot hoge toxiciteit hetgeen resulteert in zeer hoge behandelingsgerelateerde mortaliteit. Met behulp van minder intensieve conditionering is het mogelijk gebleken de behandelingsgerelateerde mortaliteit sterk te reduceren. Hierdoor kunnen ook oudere patiënten in aanmerking komen voor deze in opzet curatieve therapie. Daarnaast heeft de incorporatie van alemtuzumab, een monoklonaal middel dat de donor T cellen in het transplantaat voor toediening

vernietigt, in het transplantatieprotocol geleid tot een aanzienlijke reductie van GvHD en dus morbiditeit. Zoals eerder weergegeven dient in dit transplantatieprotocol dan wel na allogene SCT cellulaire immunotherapie in de vorm van DLI gegeven te worden om GvL-activiteit te induceren en persistente ziekte zo te bestrijden. Ondanks het feit dat er aanwijzingen zijn dat CLL en MCL gevoelig zijn voor GvL-activiteit na de toediening van DLI, laten de meeste studies zien dat de ziekte bij een groot percentage van de patiënten recidiveert. Om in deze patiëntengroep controle over de ziekte te bereiken, is het noodzakelijk om hogere doseringen DLI te infunderen met als gevolg aanzienlijke GvHD. Strategieën die de specificiteit van de immuunrespons tegen CLL en MCL verbeteren en resulteren in het versterken van de GvL-activiteit met daarbij reductie van GvHD zijn essentieel om te komen tot betere uitkomsten in deze patiëntengroep.

Dit proefschrift

De introductie van minder toxische conditionerschemata (reduced intensity conditioning (RIC)) als voorbereiding op een allogene SCT heeft geleid tot sterk gedaalde behandelingsgerelateerde mortaliteit. Dit maakt het nu zinvol om RIC allogene SCT als potentiële curatieve behandeling aan te bieden aan patiënten met chronische B-cel leukemie die onvoldoende gereageerd hebben op de conventionele behandelingen. Echter, na allogene SCT en ondanks toediening van DLI wordt bij veel patiënten recidiverende ziekte geconstateerd. De maligne B cellen zijn schijnbaar in staat om te ontkomen aan de donor T-cel gemedieerde reactiviteit. Verder zijn de herhaaldelijk toediening van steeds hogere doseringen DLI noodzakelijk om persisterende ziekte na allogene SCT te behandelen hetgeen resulteert in aanzienlijke morbiditeit door GvHD. De verminderde T-cel herkenning na transplantatie zou kunnen worden verklaard door het ontbreken van expressie van belangrijke costimulatoire en adhesie moleculen. In dit proefschrift zijn de APC functie van de CLL en MCL cellen bestudeerd en is geanalyseerd wat de mogelijkheden zijn om deze maligne B cellen te transformeren in professionele APC cellen. Vervolgens is onderzocht in hoeverre deze maligne APC cellen in staat waren een T-cel respons tegen de CLL of MCL te induceren met donor T cellen afkomstig van zowel onverwante HLA-gematchte als verwante HLA-identieke donoren. In dit proefschrift zijn verder T-cel responsen bestudeerd bij patiënten met CLL die behandeld zijn met een T-cel gedepleteerde RIC allogene SCT gevolgd door cellulaire immunotherapie middels DLI.

Transformatie van CLL cellen in maligne antigeen presenterende cellen

In **hoofdstuk 2** worden de expressieniveaus van verschillende costimulatoire en adhesie moleculen op CLL cellen van 14 verschillende patiënten beschreven. CLL cellen hadden een hoge expressie van HLA klasse I, II en het costimulatoir molecuul CD40 op hun celmembraan. Expressie van de belangrijke costimulatoire moleculen CD80, CD86 en CD83 ontbrak echter volledig. Ook adhesie moleculen kwamen minimaal tot expressie. CLL cellen kunnen daardoor, ondanks dat het van oorsprong B cellen zijn, slecht functioneren als APC cellen. Om de APC functie te verbeteren, werd geanalyseerd in hoeverre bepaalde stimulerende cytokines in staat waren het expressieniveau van de costimulatoire moleculen te verhogen. Dit was niet succesvol. Aangezien normale maar ook maligne B cellen bepaalde receptoren (toll-like receptor) op hun celmembraan hebben die na activatie de APC functie van de B cel kan verbeteren, werd stimulatie van die toll-like receptor getest middels zijn agonist CpG. CpG in combinatie met het cytokine IL-4 resulteerde in enige opregulatie maar nog steeds geringe expressie van de belangrijkste costimulatoire en adhesie moleculen. Echter, stimulatie van het CD40 molecuul op de CLL cel met zijn stimulator CD40 ligand (CD40L) resulteerde in superieure activatie van de CLL cel. Dit gebeurde door gebruik te maken van muizefibroblasten die middels transfectie het humane CD40L hoog tot expressie hebben. Het toevoegen van IL-4 maximaliseerde de expressie van alle costimulatoire moleculen en adhesie moleculen. Na vier dagen van CD40 stimulatie in aanwezigheid van IL-4 was de expressie het hoogst en veranderde de morfologie van de CLL cellen in dendritisch-achtige cellen. Deze maligne APC cellen bleken functioneel in staat om het belangrijke immunostimulatoire cytokine IL-12 te produceren. Samengevat

kon geconcludeerd worden dat stimulatie van de CD40-receptor op de CLL cel in de aanwezigheid van IL-4 voor een periode van vier dagen resulteerde in transformatie van de CLL cel in een morfologische en fenotypische karakteristieke CLL-APC cel die de capaciteit had om significante hoeveelheden IL-12 te produceren.

Inductie van CLL-reactieve T cel responsen

Door donor T cellen *in vitro* te stimuleren met gemanipuleerde leukemiecellen van de patiënt kunnen populaties van zogenaamde cytotoxische T lymfocyten (CTL) gegenereerd worden die preferentieel leukemie-reactief zijn. Het toedienen van *in vitro* gegenereerde en geëxpandeerde leukemie-actieve CTL lijnen aan de patiënt na allogene SCT zou kunnen leiden tot een versterkte GvL-activiteit en mogelijk verminderde GvHD. De proof of principle is aangetoond bij een patiënt met CML in geacceleerde fase, die na toediening van CML-actieve donor T cellen na allogene SCT in een voortdurend complete respons bleef. In hoeverre deze behandelstrategie ook bij patiënten met CLL mogelijk is, was onderwerp van studie in **hoofdstuk 2 en 3**. Allereerst werd onderzocht of de primaire ongemanipuleerde CLL cellen en/of de gegenereerde CLL APC cellen zoals beschreven in hoofdstuk 2 in staat waren om donor T cellen afkomstig van onverwante HLA klasse I-gematchte donoren te stimuleren. Aangezien er een HLA klasse II mismatch bestond, vond bij de inductie van de T-cel respons depletie plaats van de CD4⁺ donor T cellen. In alle drie onderzochte donor/patiënten koppels konden primaire CLL cellen als stimulator cellen de donor T cellen niet activeren. Stimulatie van de donor T cellen met de CLL-APC cellen leidde echter tot sterke proliferatie van die T cellen in alle onderzochte koppels. De gegenereerde T cel lijnen vertoonden cytotoxiciteit tegen de primaire CLL en de CLL APC cellen gemeten in een standaard ⁵¹Cr release assay. De cytotoxiciteit kon volledig geblokkeerd worden door toevoeging van antistoffen tegen HLA klasse I aangevend dat herkenning HLA gerestricteerd was. In aanvullende experimenten in een donor/patiënten paar werden uit een cytotoxische T cellijn door middel van limiting dilution CTL klonen verkregen. Deze CTL klonen herkenden naast de primaire CLL en de CLL-APC ook andere patiënt-afkomstige targets en herkenden niet targets afkomstig van de donor. Deze resultaten gaven aan dat in tegenstelling tot de primaire CLL CLL-APC als stimulator cellen in staat zijn om CLL-actieve CTL lijnen en klonen te genereren uit onverwante HLA klasse I-gematchte donoren. Om tot klinische implementatie van deze immunotherapeutische strategie te kunnen komen, was het vervolgens noodzakelijk om te onderzoeken in hoeverre het induceren van CLL-actieve T-cel responsen in complete HLA-gematchte familiedonoren mogelijk was.

In **hoofdstuk 3** werd gedemonstreerd dat ook in HLA-identieke setting het induceren van CLL-actieve T-cel responsen door gebruik te maken van de stimulerende capaciteit van de gegenereerde CLL APC haalbaar was. Zowel CD4⁺ als CD8⁺ CTL klonen konden gegenereerd worden. Deze waren in staat CLL-specifieke targets maar ook andere B-cel targets en T cel targets van patiënt-origine te doden. Deze klonen herkenden dus mHag die verschillend tot expressie werden gebracht in patiënt en donor. Het door de klonen herkende mHag op de patiënt was dus niet CLL-, B-cel-, of T cel-specifiek. Een mHag-specifieke kloon werd verder geanalyseerd. Deze kloon bleek HLA-B8 gerestricteerd. Door

gebruik te maken van mesenchymale stamcellen, gekweekt uit het beenmerg van de patiënt, konden vervolgens experimenten verricht worden om te analyseren in hoeverre de door de kloon herkende mHag ook in niet-hematopoietisch weefsel tot expressie kwam. De CTL kloon herkende wel alle hematopoietische targets en niet de niet-hematopoietische target, de mesenchymale stamcel. Dit zou kunnen impliceren dat deze gegenereerde kloon in staat is primaire CLL te doden zonder significante GvHD te induceren doordat het herkende mHag vooral tot expressie komt op hematopoiese en niet op andere weefsels. Deze resultaten illustreerden de haalbaarheid om met behulp van de CLL-APC als stimulators te komen tot initiatie van CLL-reactieve en mHag-specifieke T-cel responsen, die relatief hematopoiese-specifiek zijn in een HLA-identieke setting. Deze studie liet verder zien dat de gebruikte limiting dilution methode zeer arbeidsintensief was, en leidde tot langdurige *in vitro* kweekperiodes. Om in de kliniek tot toediening van CLL-reactieve CTL klonen na transplantatie te komen, dienen meer efficiëntere methodes ontwikkeld te worden die kunnen resulteren in vroege selectie en isolatie van CLL-reactieve T cellen.

Genereren van MCL-reactieve T cel responsen

In **hoofdstuk 4** bleken uit experimenten de expressieniveaus van costimulatoire en adhesie moleculen op primaire MCL cellen conform primaire CLL cellen onvoldoende te zijn om MCL-reactieve donor T-cel responsen op te wekken. Er werd getracht de primaire MCL cellen te transformeren in professionele APC cellen door CD40 activatie en door middel van stimulatie met het MCL-specifieke cytokine IL-10, met IL-4, CpG. Ligatie van het CD40 molecuul op de MCL cel was essentieel voor de opregulatie van costimulatoire moleculen. Vier dagen van CD40 stimulatie resulteerde in de meest optimale expressie van costimulatoire en adhesie moleculen en in een hoge productie van het belangrijke immunostimulatoire cytokine IL-12. Deze MCL APC cellen als stimulator cellen waren vervolgens in staat om MCL-reactieve T-cel responsen op te wekken in HLA klasse I-gematchte donoren. Dit resulteerde in de generatie van grote aantallen mHag-specifieke CTL klonen, die in staat waren de primaire MCL cellen zeer effectief te elimineren.

Het karakteriseren van graft-versus-CLL responsen

In **hoofdstuk 5** werden de resultaten en uitkomsten besproken bij twaalf patiënten met agressieve CLL, die behandeld werden met een T-cel gedepleteerde RIC allogene SCT, gebruikmakend van alemtuzumab in het transplantaat dat depleteerde voor donor en ontvanger T cellen. Onderdeel van het protocol was het toedienen van DLI na transplantatie om GvL activiteit te induceren en zo persisterende ziekte te eradiceren. Na transplantatie werd bij alle patiënten persistent donoren chimerisme waargenomen zonder toegenomen incidentie van transplantaat afstoting met verder minimale en acceptabele GvHD. Na toediening van DLI voor gemengd chimerisme en/of persisterende ziekte werden in sommige patiënten langdurige remissies verkregen, illustrerend dat CLL cellen gevoelig zijn voor het GvL effect. Echter, bij andere patiënten werd persisterende of progressieve ziekte geobserveerd ondanks het toedienen van oplopende doseringen van DLI. Om deze verschillen in klinische responsen verder te karakteriseren, werden *in vitro* experimenten verricht gebruikmakende van T cellen die verkregen zijn van op DLI responderende en niet op DLI responderende patiënten. Ook werden T cellen verkregen van de oorspronkelijke donor. De T cellen

werden gestimuleerd met de primaire CLL cellen en de CLL-APC cellen. Indien T cellen geactiveerd worden door de stimulatorcel kunnen zij immuunmodulerende cytokines zoals interferon gamma (IFN γ) produceren. In deze studie werden leukemie-reactieve T cellen geïsoleerd op basis van hun IFN γ productie in respons op primaire CLL en CLL-APC door middel van de IFN γ secretie assay. In overeenstemming met de experimenten in hoofdstuk 2 en 3, bleken primaire CLL cellen onvoldoende stimulatorische capaciteit te hebben om CLL-reactieve T cellen te stimuleren. CLL-APC cellen konden CLL-reactieve mHag-specifieke T-cel responsen induceren bij de patiënt met een goede klinische respons na allogene SCT en de toediening van DLI. Dit kon niet bij de patiënt die progressieve ziekte vertoonde ondanks oplopende doseringen van DLI. Vervolgens werden de experimenten herhaald met de T cellen van de oorspronkelijke donor van de niet-responderende patiënt om te onderzoeken in hoeverre voorloper CLL-reactieve T cellen überhaupt wel aanwezig waren in de donor. Na activatie met CLL-APC konden met gebruik van de IFN γ secretie assay CLL-reactieve CTL klonen worden verkregen. Deze resultaten demonstreerden dat voorloper CLL-reactieve T cellen die aanwezig zijn in de donor *in vivo* onvoldoende gestimuleerd werden door de primaire CLL. Dat berustte waarschijnlijk op het ontbreken van een APC fenotype. CLL-reactieve T cellen zijn dus niet in staat om een adequate immuun respons tegen persisterende CLL cellen op te wekken. Dit zou de reden kunnen zijn voor de klinische observaties van continue recidieven na allogene SCT en na de toediening van DLI.

Inzichten en vooruitzichten

Inzichten

De resultaten in dit proefschrift laten zien dat primaire CLL en MCL cellen onvoldoende in staat waren om te functioneren als APC cellen door het ontbreken van voldoende expressie van costimulatorische en adhesie moleculen. De primaire CLL en MCL cellen waren daarom niet in staat een relevante immuunrespons te induceren. CD40 stimulatie transformeerde deze leukemie cellen in professionele maligne IL-12 producerende APC cellen. Deze CLL-APC en MCL-APC cellen hadden de stimulatorische capaciteit om CLL- en MCL-reactieve T-cel responsen te initiëren in HLA-gematchte donoren. Repetitieve *in vitro* stimulatie van donor T cellen met de maligne APC cellen resulteerde in de generatie van leukemie-reactieve mHag-specifieke CTL klonen die preferentieel hematopoiese-specifieke targets herkenden. De relevantie van deze resultaten werd gedemonstreerd in een studie die de uitkomsten beschreef van patiënten met agressieve CLL die behandeld waren met een T-cel gedepleteerde RIC allogene SCT gevolgd door toediening van DLI voor het initiëren van GvL reactiviteit. Sommige patiënten hadden een zeer goede klinische respons wat illustreerde dat deze behandeling curatieve potentie heeft. Andere patiënten hadden echter continue recidieven na allogene SCT en DLI. De *in vitro* experimenten in een niet-responsieve patiënt demonstreerden dat voorloper CLL-reactieve T cellen aanwezig waren in de donor maar na transplantatie *in vivo* niet geactiveerd konden worden door de persisterende primaire CLL cellen. Deze observaties suggereerden dat de inadequate APC functie van primaire CLL cellen waarschijnlijk deels verantwoordelijk was voor de

afwezigheid van een klinische respons. In deze groep patiënten is het daarom noodzakelijk de effectiviteit van adoptieve cellulaire immunotherapie te verbeteren.

Vooruitzichten

In dit proefschrift werd geïllustreerd dat gemodificeerde leukemiecellen als stimulator cellen in staat zijn om donor T-cel reactiviteit tegen de primaire leukemiecellen te induceren. Met behulp van de IFN γ secretie assay was het vervolgens mogelijk om voorloper leukemie-reactieve T cellen vroegtijdig te detecteren en isoleren. Verdere efficiënte proliferatie kon bewerkstelligd worden door repetitieve stimulatie met de maligne APC cellen. Deze *in vitro* gegenereerde leukemie-reactieve T cellen zouden na toediening aan de patiënt in staat kunnen zijn om persisterende CLL of MCL cellen te eradiceren zonder inductie van uitgebreide GvHD. Immers de repetitieve stimulatie met leukemie APC cellen zou kunnen resulteren in een relatieve verrijking van leukemie-reactieve T cellen in vergelijking met GvHD-mediërende T cellen.

Met deze nieuw verworven inzichten zijn verschillende cellulaire adoptieve immunotherapeutische benaderingen die het optreden van ernstig GvHD voorkomen en de GvL-activiteit versterken te overwegen. *In vitro* gegenereerde leukemie-reactieve T cellen zouden in lage doseringen direct na allogene SCT toegediend kunnen worden om toekomstige minimale residuale ziekte te controleren en elimineren. Als alternatief zouden hoge doseringen van deze specifieke T cellen later na allogene SCT na aantonen van persisterende ziekte toegediend kunnen worden. In hoeverre deze toedieningen gecombineerd dienen te worden met lage dosis DLI voor aanvullende immunotherapeutische ondersteuning zou onderwerp van toekomstige studies kunnen zijn. Combinaties van lage dosis DLI, waaruit GvHD-inducerende T cellen zijn verwijderd, met GvL-inducerende *in vitro* gegenereerde T cellen zouden zeer synergistisch kunnen werken. Als alternatief zou het identificeren van nieuwe hematopoïetische-gerestricteerde, bij voorkeur B-cel-gerestricteerde, mHag prioriteit moeten hebben. Immers dan zouden mHag-specifieke donor T cellen zonder de inductie van GvHD, gezien het ontbreken van expressie van de mHag op niet-hematopoïetisch weefsel, na toediening de patiënt kunnen genezen van zijn ziekte. Een andere benadering zou kunnen zijn om patiënten na RIC allogene SCT te vaccineren met CLL-APC of MCL-APC als vaccin. Aangezien vaccinatiestudies bij patiënten met uitgebreide ziekte teleurstellend zijn, zou dit bij voorkeur al gegeven moeten worden bij minimaal residuale ziekte. Bij goede respons zou de vaccinatie herhaald kunnen worden om tot expansie van het memory T-cel compartiment te komen.

De uitkomsten van de *in vitro* experimenten beschreven in dit proefschrift zullen nu vertaald dienen te worden naar de klinische setting. In hoeverre de *in vitro* aangetoonde effectiviteit van de leukemie-reactieve T cellen ook *in vivo* in de patiënt werkzaam en relevant zijn, zou onderwerp van toekomstige studies en protocollen moeten zijn. Verder zal geëvalueerd moeten worden welke dosis van specifieke T cellen en welk tijdsplan van toediening na allogene SCT het meest effectief is.

