



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **HLA-DP specific responses in allogeneic stem cell transplantation**

Rutten, C.E.

### **Citation**

Rutten, C. E. (2013, June 6). *HLA-DP specific responses in allogeneic stem cell transplantation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20929>

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/1887/20929>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20929> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Rutten, Caroline

**Title:** HLA-DP specific responses in allogeneic stem cell transplantation

**Issue Date:** 2013-06-06

# 7

## Nederlandse Samenvatting



## Nederlandse Samenvatting

Allogene stamceltransplantatie (SCT) is een succesvolle behandeling voor patiënten met allerlei kwaadaardige hematologische ziekten. Voorafgaand aan de SCT krijgen patiënten hoge dosis chemotherapie en bestraling om kwaadaardige cellen te vernietigen en om het hematopoietische- en dus afweersysteem van de patiënt te onderdrukken om zo plaats te maken voor donor stamcellen. Oorspronkelijk was het doel van de SCT het vervangen van het lethaal beschadigde hematopoietische systeem van de patiënt. Autologe stamcellen of stamcellen van een genetische identieke tweeling werden verondersteld de beste bron voor hematologische stamcellen te zijn. Transplantatie met stamcellen van een allogene donor bleek namelijk gepaard te gaan met immunologische complicaties zoals afstoting of *graft versus host ziekte* (GVHD). Bij GVHD worden gezonde weefsels van de patient, zoals huid, darmen en lever, aangevallen door het afweersysteem van de donor. Deze afstotingsreactie kan mild zijn, maar ook een levensbedreigende complicatie vormen. Klinische studies toonden echter aan dat het optreden van GVHD ook gepaard ging met een verminderde kans op recidief van de ziekte wat resulteerde in een betere uiteindelijke overleving. Afweercellen (T cellen) van de donor, die ook in het stamceltransplantaat aanwezig zijn, bleken niet alleen verantwoordelijk voor het optreden van GVHD maar zijn ook in staat een zogenaamd *graft versus leukemie* (GVL) effect te bewerkstelligen. Verwijdering van T cellen uit het transplantaat verminderde de kans op GVHD, maar vergrootte de kans op een recidief van de leukemie. Daarnaast bleek een donor lymfocyten infusie (DLI) bij een recidief van de ziekte na SCT, een langdurige remissie van verschillen hematologische maligniteiten te kunnen induceren. Het grote voordeel van een SCT met een allogene donor boven eigen stamcellen is dus dat het immuunsysteem van de donor gebruikt kan worden om resterende kwaadaardige cellen van de patiënt na de transplantatie op te ruimen. Echter het grote probleem van immunotherapie door middel van DLI is GVHD. Een belangrijk doel in SCT onderzoek is dan ook om strategieën voor immunotherapie te ontwikkelen waarbij er minder GVHD optreedt maar met behoud van GVL-reactiviteit.

### GVL-reactiviteit en GVHD bij HLA-identieke SCT

Om het risico op afstoting en GVHD te beperken, wordt voor een SCT bij voorkeur gebruik gemaakt van een HLA-identieke donor. HLA-moleculen zijn eiwitten op het celoppervlak van cellen, die antigenen aan T cellen presenteren. HLA-klasse I moleculen (HLA-A, -B en -C) zitten op vrijwel alle kernhoudende cellen. HLA-klasse II moleculen (HLA-DR, -DQ en -DP) komen voornamelijk op hematopoietische cellen tot expressie. Allo-reactieve T cellen die vreemde HLA-moleculen herkennen, zijn aanwezig in hoge frequenties in perifeer bloed. Een HLA-niet-identieke SCT kan daarom leiden tot sterke allo-reactiviteit met daarbij een hoog risico op GVHD. Echter ook na een HLA-identieke SCT of DLI treedt vaak GVHD op. Dit wordt veroorzaakt door genetische verschillen tussen patiënt en donor anders dan HLA-moleculen, zogenaamde minor histocompatibility antigenen (MiHA). Dit zijn stukjes

eiwitten, verschillend tussen patient en donor, die in HLA-moleculen gepresenteerd worden. Donor T cellen kunnen MiHA van de patiënt als lichaamsvreemd herkennen en een immuunrespons hiertegen ontwikkelen. Verschillende studies hebben aangetoond dat MiHA-specifieke T cellen betrokken zijn bij GVHD en GVL-activiteit. Kinetiek studies hebben laten zien dat het opkomen van deze T cellen gepaard gaat met het verdwijnen van kwaadaardige cellen uit het bloed wat het GVL-effect illustreert. In patiënten die gerepondeerd hebben op DLI na HLA-identieke SCT zijn polyklonale immuunresponsen gevonden gericht tegen verschillende MiHAs.

T cel responsen gericht tegen MiHA die zowel op hematopoietische cellen als op niet-hematopoietische cellen tot expressie komen zullen waarschijnlijk leiden tot zowel GVL-activiteit als GVHD. Een immunologische respons van CD8+ T cellen tegen een breed tot expressie komend MiHA gepresenteerd in een HLA-klasse I molecuul leidt tot zowel GVL-activiteit als ook herkenning en dus schade in verschillende organen, resulterend in ernstige GVHD. Een CD8+ T cel respons specifiek voor een hematopoiese gerestricteerd antigeen leidt tot selectieve GVL-activiteit. In tegenstelling tot de HLA-klasse I moleculen komen HLA-klasse II moleculen vooral tot expressie op hematopoietische cellen. Bij patienten met een HLA-klasse II positieve hematologische maligniteit zou dus een immuunrespons tegen een HLA-klasse II gerestricteerd MiHA kunnen leiden tot een selectief GVL-effect. Inderdaad zijn deze CD4+ T cel responsen gevonden in patiënten bij wie geen GVHD plaats vond. Uitgebreide analyse van immuunresponsen in patiënten met en sterk anti-leukemie effect met en zonder GVHD, heeft laten zien dat immuunresponsen met een hoge amplitude gericht tegen breed tot expressie komende antigenen leidt tot zowel GVL-activiteit als GVHD, waar beperkte immuunresponsen gericht tegen hematopoiese gerestricteerde antigenen vaker resulteerden in selectieve GVL-activiteit.

Traditioneel worden CD8+ T cellen gezien als primaire effector cellen in GVL-activiteit, en CD4+ T cellen als helper cellen voor het induceren en in stand houden van CD8+ T cel immuunresponsen. In patiënten met selectieve GVL-responsen zijn echter ook CD4+ T cellen gevonden met een direct cytotoxische activiteit tegen leukemie cellen. Dit suggereert dat CD4+ T cellen ook als effector cellen kunnen fungeren in GVL-activiteit. Omdat de expressie van HLA-klasse II moleculen dus met name gerestricteerd is tot hematopoietische cellen zou een CD4+ T cel immuunrespons kunnen leiden tot selectieve GVL-activiteit. Klinische studies hebben inderdaad laten zien dat het verwijderen van CD8+ T cellen van het SCT of van DLI kan leiden tot minder GVHD met behoud van GVL-activiteit. Echter, expressie van HLA-klasse II moleculen op niet-hematopoietische cellen kan worden opgeregeerd bij expositie aan pro-inflammatoire cytokines. Een HLA-klasse II gerestricteerde immuunrespons kan dan alsnog resulteren in GVHD.

### **SCT van een onverwante donor**

Een allogene SCT wordt bij voorkeur uitgevoerd met een HLA-identieke donor om het risico van GVHD en afstoting te beperken. De optimale donor is een HLA-identieke broer of zus van de patiënt. Deze is echter niet altijd beschikbaar. Als er geen geschikte familie donor is, is een HLA-identieke onverwante donor een goed alternatief. Bij voorkeur wordt een volledig identieke donor voor HLA-A,-B,-C, -DRB1 en -DQB1 gebruikt. Grote studies hebben laten zien dat een mismatch voor HLA-A, -B, -C en -DRB1 geassocieerd is met een slechtere uitkomst. Een mismatch voor alleen HLA-DQB1 resulteerde niet in een slechtere overleving, echter in combinatie met een andere mismatch werd een nog slechtere uitkomst gezien. Een mismatch voor HLA-DPB1 resulteerde niet in een slechtere overleving en daarom wordt er bij de donor selectie niet gekeken naar HLA-DPB1.

### **De rol van HLA-DPB1 in allogene SCT**

HLA-DP is het zesde klassieke HLA-molecuul. Vanwege een recombinatie 'hotspot' tussen de HLA-DPB1 genen en de overige HLA-genen, wordt HLA-DP niet gelinkt aan de andere HLA-genen overgeërfd. Dit resulteert in een mismatch kans voor HLA-DPB1 tot 10% bij een broer of zus en een mismatch kans tot 90% bij onverwante donoren. Lange tijd is de rol van HLA-DPB1 in onverwante SCT niet duidelijk geweest. Studies toonden wisselende resultaten in data betreffende een risico op GVHD en overleving. HLA-DPB1 werd daarom niet meegenomen in donor selectie. Grote klinische studies uitgevoerd tussen 1999 en 2008 hebben echter laten zien dat HLA-DP zich gedraagt als een klassiek transplantatie antigen. Bij een SCT met T cellen werd bij een HLA-DPB1 niet-identieke donor meer GVHD en een lagere recidief kans gezien in vergelijking met een HLA-DPB1 identieke donor. Dit resulteerde in een gelijke totale overleving. In T cel gedepleteerde SCT werd geen verhoogd risico op GVHD gezien, maar wel een lagere kans op recidief van de ziekte.

Verder bewijs van een immunologische rol voor HLA-DP werd geleverd door verschillende studies waarbij na allogene HLA-DPB1 niet-identieke SCT, CD4+ T cellen gericht tegen het niet-identieke HLA-DP molecuul werden gevonden. HLA-DP specifieke CD4+ T cellen werden geïsoleerd uit huidbiopten van patiënten die GVHD ontwikkelden en uit een patiënt die het SCT afstootte. Er werd gesuggereerd dat HLA-DP specifieke T cellen wellicht selectieve GVL-activiteit konden induceren bij T cel gedepleteerde SCT. Echter direct bewijs hiervoor werd niet geleverd.

### **Permissive en non-permissive mismatches**

Vanwege conflicterende resultaten in verschillende studies over de rol van HLA-DP in allo-SCT, is gesuggereerd dat er wellicht een verschil in immunogeniciteit tussen verschillende HLA-DPB1 mismatches zou zijn. Verschillen in aminozuren in specifieke delen van het HLA-DP molecuul zouden gunstig of ongunstig zijn. Verschillende onderzoeksgroepen vonden

andere specifieke mismatches die geassocieerd zouden zijn met meer GVHD of een slechtere overleving. Zino en medewerkers ontwikkelden een algoritme waarbij HLA-DPB1 mismatches werden ingedeeld in 3 en later 4 verschillende groepen. Dit was gebaseerd op het herkenningspatroon van enkele T cel klonen. Een mismatch tussen HLA-DPB1 moleculen met grote onderlinge gelijkheid werd 'permissive' genoemd en een mismatch tussen HLA-DPB1 moleculen uit verschillende groepen werd 'non-permissive' genoemd. In een cohort studie bleek een 'non-permissive' mismatch geassocieerd met een slechtere overleving.

Diverse bevindingen van de verschillende onderzoeksgroepen konden echter niet bevestigd worden in andere studies.

### **Mismatched HLA-DP als een target voor GVL-activiteit**

Een immuunrespons gericht tegen een hematopoïetisch gerestriceerd antigeen wordt verwacht te resulteren in selectieve GVL-activiteit, terwijl een immuunrespons tegen een breed tot expressie komend antigeen kan resulteren in zowel GVL-activiteit als GVHD. Tegelijkertijd blijken beperkte immuunresponsen met lage frequenties MiHA-specifieke T cellen GVL-activiteit te induceren, waar bredere immuunresponsen gericht tegen meerdere antigenen zowel GVL als GVHD induceren. Omdat allo-actieve T cellen in hoge frequenties aanwezig zijn in perifere bloeds, zou een immuunrespons gericht tegen een niet-identiek HLA-DPB1 molecuul kunnen leiden tot een sterke immuunrespons en daarmee naast GVL-activiteit ook GVHD kunnen induceren. Bij HLA-DPB1 niet-identieke SCT met T cellen wordt zowel een hoger risico op GVHD gezien als een lager risico op recidief van de ziekte. Bij T cel gedepleteerde SCT wordt wel een lager risico op recidief gezien, maar niet een verhoogd risico op GVHD. Deze data wijzen erop, dat bij HLA-DPB1 niet-identieke SCT het gebruikte transplantatie regime in combinatie met individuele omstandigheden in de patiënt, de balans tussen GVHD en GVL-activiteit zouden kunnen bepalen.

### **Dit proefschrift**

HLA-DPB1 wordt niet meegenomen in donor selectie voor een hematologische SCT. Dit komt omdat een HLA-DPB1 niet-identieke SCT niet geassocieerd is met lagere overlevingskansen vergeleken met een HLA-DPB1 identieke SCT. Mismatches voor HLA-DPB1 is echter wel geassocieerd met een verhoogd risico op GVHD en een lagere kans op recidief van de ziekte. Bij een T cel gedepleteerde HLA-DPB1 niet-identieke SCT werd geen verhoogd risico op GVHD gevonden, maar wel een significant lager risico op recidief van de ziekte. In dit proefschrift is bestudeerd of HLA-DP gebruikt kan worden als een relatief specifiek target voor anti-leukemie activiteit na een T cel gedepleteerde HLA-DPB1 niet-identieke SCT. Verder is er gekeken of er bij alle HLA-DPB1 mismatch combinaties verwacht kan worden dat er een immuunrespons optreedt. Daarnaast is bestudeerd of

een HLA-DP specifieke immuunrespons ook daadwerkelijk vaak optreedt na HLA-DPB1 niet-identieke SCT en DLI, en of het optreden van een HLA-DP specifieke immuunrespons dan ook geassocieerd is met een anti-leukemie effect of GVHD.

Om te kijken of HLA-DP specifieke T cellen een anti-leukemie reactie kunnen bewerkstelligen na HLA-DPB1 niet-identieke SCT en DLI hebben we in **hoofdstuk 2** de immuunrespons in een patiënt met een chronische B cel leukemie die goed reageerde op DLI na HLA-DPB1 niet-identieke SCT bestudeerd. Patiënt en donor waren volledig identiek voor HLA-A, -B, -C, -DRB1 en -DQB1. De patiënt was getypeerd HLA-DPB1\*0201;0301 en de donor HLA-DPB1\*0402;0501. Er vond een sterke anti-leukemie respons plaats met slechts beperkte GVHD van de huid wat resulteerde in een complete remissie van de ziekte. Met behulp van ELISPOT analyse werd een CD4+ T cel respons geïdentificeerd die 6 weken na DLI begon. Na isolatie en opgroeien van de leukemie reactieve CD4+ T cellen tot T cel klonen, kon met behulp van experimenten met blokkerende antilichamen, panel experimenten waarbij herkenning van cellijnen met verschillende HLA-DPB1 moleculen getest werd, en retrovirale transductie van beide gemismatchte HLA-DPB1 moleculen, HLA-DPB1\*02 en HLA-DPB1\*03 geïdentificeerd worden als het doelwit van deze immuunrespons. De anti-leukemie respons bleek veroorzaakt door een polyklonale T cel respons die zowel uit helper als uit cytotoxische CD4+ T cellen bestond. Omdat het ontstaan en de kinetiek van de anti-leukemie specifieke CD4+ T cellen overeen kwam met het verdwijnen van de kwaadaardige cellen uit het bloed, lijkt het waarschijnlijk dat deze HLA-DP specifieke CD4+ T cellen de antitumor respons veroorzaakt hebben. De geïsoleerde HLA-DP specifieke CD4+ T cellen waren ook in staat om myeloïde en lymfatische maligne hematologische cellen van andere patiënten te herkennen en te lysisen. Herkenning van niet-hematologische cellen werd bekeken door herkenning van fibroblasten, niercelcarcinoom cellijnen en borstkanker cellijnen te bestuderen. HLA-DP kwam niet tot expressie op de meeste van deze cellijnen in rust en deze cellen werden dus ook niet herkend door de CD4+ T cellen. Echter, behandeling met IFN- $\gamma$  om een pro-inflammatoire situatie na te bootsen, resulteerde in opregulatie van HLA-DP en specifieke HLA-DP gerestricteerde herkenning van deze niet hematopoietische cellen. De resultaten illustreren dat HLA-DP mogelijk een relatief specifiek doelwit kan zijn voor anti-leukemie reactiviteit en dat een HLA-DPB1 gemismatchde SCT de voorkeur zou kunnen krijgen over een HLA-DPB1 identieke SCT bij HLA-klasse II positieve hematologische maligniteiten om op deze manier gebruik te kunnen maken van HLA-DP als een target voor immunotherapie. Het toedienen van donor T cellen na een T cel gedepleteerde HLA-DPB1 niet-identieke SCT zou op die manier kunnen resulteren in een sterk anti-leukemie effect zonder een groot risico op ernstige GVHD.

Een aantal studies heeft laten zien dat specifieke HLA-DPB1 mismatches waren geassocieerd met een slechtere overleving. Er is gesuggereerd dat dit ongunstige effect werd veroorzaakt door een verschil in immunogeniciteit tussen verschillende HLA-



DP allelen. Op basis hiervan werd een algoritme ontwikkeld waarin permissive en non-permissive HLA-DPB1 mismatches werden gedefinieerd. Dit algoritme was gebaseerd op kruisherkenningpatronen van HLA-DP specifieke CD4+ T cellen. Er werd gesuggereerd dat bij permissive mismatches geen T cel responsen geïnduceerd zou worden door hoge mate van overeenkomst tussen het HLA-DPB1 molecuul van patiënt en donor. Bij non-permissive mismatches zou er juist wel een sterke T cel respons plaatsvinden en daarmee een grotere kans op het ontstaan van GVHD.

In **hoofdstuk 3** hebben we gekeken of 'permissive' HLA-DPB1 specifieke immuunresponsen in vivo voorkomen. We hebben de immuunrespons in 2 patiënten geanalyseerd die reageerden op DLI bij een HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 identieke, HLA-DPB1 niet-identieke SCT. De ene patiënt had een 'permissive' HLA-DPB1 niet-identieke SCT gekregen en de andere een 'non-permissive' HLA-DPB1 niet-identieke SCT. CD4+ T cellen werden uit het bloed geïsoleerd op het moment van de klinische respons op DLI en getest op specifieke herkenning van patiënt HLA-DP moleculen. In beide patiënten werd specifieke herkenning van patiënt en niet donor HLA-DP moleculen gevonden. Verder laten we voor vier andere individuen zien dat zowel 'permissive' als 'non-permissive' HLA-DPB1 specifieke immuunresponsen even effectief gegenereerd kunnen worden. Dit illustreert immunogeniciteit van zowel 'non-permissive' als 'permissive' mismatches.

In **hoofdstuk 4** gaan we hier verder op in. We hebben bestudeerd of immunogeniciteit van HLA-DPB1 mismatches voorspeld kan worden gebaseerd op de aan- of afwezigheid van specifieke aminozuur sequenties. We hebben een model ontwikkeld waarin we in vitro allo-HLA-DP immuunresponsen konden genereren. In totaal hebben we 48 verschillende stimulator/responder combinaties getest door CD4+ T cellen van 5 HLA-DPB1 homozygote individuen te stimuleren met dezelfde antigen presenterende cellen waarin verschillende HLA-DP moleculen getransduceerd waren. We laten zien dat vrijwel alle combinaties resulteerden in hoge frequente immuunresponsen. Verder laten we in dit hoofdstuk zien dat kruisherkenning van verschillende HLA-DPB1 moleculen door HLA-DP specifieke T cellen een veel voorkomende observatie is. Individuele CD4+ T cel klonen met dezelfde specificiteit lieten verschillende herkenningpatronen in kruisreactiviteit zien. Dit illustreert dat ze specifiek voor een ander epitoom zijn. We bevestigen eerder beschreven patronen in kruisherkenning, maar laten ook patronen zien die niet overeenkomen met het voorgestelde algoritme. Deze data samen illustreren dat een hoge mate van overeenkomst tussen HLA-DPB1 allelen voorspellend is in kruis-reactieve herkenning, maar niet voor immunogeniciteit. Ook laten we zien dat T cel herkenningpatronen allo-reactiviteit niet kunnen voorspellen.

Om te kijken of HLA-DP specifieke immuunresponsen vaak voorkomen na T cel gedepleteerde HLA-DPB1 niet-identieke SCT en DLI hebben we in **hoofdstuk 5** een methode ontwikkeld om bloed van patiënten te screenen op de aanwezigheid van HLA-DP specifieke CD4+ T cellen. Door HeLa cellen getransduceerd met verschillende HLA-

DP moleculen te gebruiken als stimulator cellen, konden we het opkomen van patiënt HLA-DP specifieke T cel responsen op een eenvoudige en effectieve manier meten. We laten zien dat patiënt HLA-DP specifieke immunoresponsen vaak gevonden worden na T cel gedepleteerde HLA-DPB1 niet-identieke SCT en DLI. (14 van de 24 patiënten: 58%). De aanwezigheid van HLA-DP specifieke CD4+T cellen leek te correleren met klinische respons op DLI omdat HLA-DP specifieke CD4+ T cellen werden gevonden in 13 (72%) van de 18 patiënten met een klinische respons op DLI en slechts in 1 (17%) van de 6 patiënten waarbij geen klinische respons werd gezien. HLA-DP specifieke T cellen werden vooral gevonden in patiënten die ernstige GVHD ontwikkelden, maar ook in een significant aantal patiënten dat alleen een GVL-reactie na DLI ontwikkelde zonder GVHD. HLA-DP specifieke CD4+ T cellen werden gevonden in patiënten met verschillende hematologische maligniteiten, waaronder de ziekte van Kahler, B-cel maligniteiten en myeloïde leukemieën.

De resultaten van het onderzoek beschreven in dit proefschrift laten zien dat HLA-DPB1 niet-identieke SCT gevolgd door DLI laat na de transplantatie kan resulteren in een selectief GVL-effect. We hebben laten zien dat alle HLA-DPB1 mismatches immunogeen zijn en kunnen resulteren in sterke immunoresponsen. In een cohort van 24 patiënten die een SCT gevolgd door DLI ontvingen voor allerlei hematologische ziekten van een HLA-DPB1 niet-identieke donor, werden zeer frequent HLA-DP specifieke immunoresponsen gevonden. Bovendien correspondeerde de aanwezigheid van HLA-DP specifieke T cellen met het optreden van een klinische respons, waarbij er zowel selectieve GVL-reacties werden gezien als GVHD. Waarschijnlijk wordt de uiteindelijke balans tussen GVHD en GVL-activiteit na HLA-DPB1 niet-identieke T cel gedepleteerde SCT en DLI in ieder individu bepaald door het ontwikkelen van HLA-DP specifieke immunoresponsen, de lokale omstandigheden in de patiënt in combinatie met de aan- of afwezigheid van andere immunoresponsen.



