

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19981> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hambach, Lothar Wolfgang Heinrich

Title: The human minor histocompatibility antigen HA-1 as target for stem cell based immunotherapy of cancer : pre-clinical and clinical studies

Issue Date: 2012-10-16

Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft studies die een bijdrage leveren aan het ontwerpen van optimale klinische studies voor het uitroeien van leukemie en solide tumoren door immunotherapie die gericht is tegen minor histocompatibility antigenen (mHags). Deze nieuwe therapeutische benadering zal worden toegepast bij patiënten met kanker na allogene stamceltransplantatie (SCT).

HLA (human leucocyt antigen) identieke allogene stamceltransplantatie (SCT) is een gevestigde curatieve behandeling voor hematopoïetische maligniteiten. Er wordt onderzocht of deze immunotherapeutische aanpak geschikt is voor de behandeling van solide tumoren. De genezende werking van allogene SCT is gebaseerd op de zogenaamde graft-versus-tumor reacties (GVT) die gemedieerd worden door het getransplanteerde donor immuunsysteem. Dit betekent dat killercellen, vooral T cellen, aanwezig in het stamceltransplantaat, in staat zijn leukemie en solide tumor cellen van de patiënt te herkennen en uit te schakelen. Deze curatieve immuunreacties gaan vaak gepaard met een ernstige bijwerking van allogene SCT, namelijk graft-versus-host disease (GvHD). GvHD is het resultaat van een sterke immuunreactie van de donor T-cellen en leidt tot het doden van vooral epitheliale cellen in het lichaam. Deze reactie geeft een aanzienlijke morbiditeit en mortaliteit. Om ernstige GvHD te voorkomen, worden patiënten en donoren vaak op elkaar afgestemd op basis van grote histocompatibiliteitsantigenen, de zogenaamde "menselijke leukocyten antigenen (HLA)". Echter, HLA overeenkomst blijkt niet voldoende te zijn om GvHD te voorkomen. Dus, andere dan HLA antigenen verschillen tussen donor en ontvanger zijn verantwoordelijk voor deze immuunreacties. Deze antigenen worden minor histocompatibility (mHags) antigenen genoemd. Belangrijk is dat niet alleen GvHD, maar ook de GvT effecten voornamelijk door verschillen in de mHags tussen HLA identieke donor en ontvanger teweeg worden gebracht.

mHags zijn polymorfe "peptiden". Het zijn eiwitfragmenten die op het celoppervlak gepresenteerd worden in de context van HLA moleculen. Polymorf betekent dat ze in verschillende varianten, zogenaamde allelen, voorkomen en kunnen variëren tussen donor en ontvanger. De mHag allelen aanwezig bij een patiënt of donor kunnen eenvoudig voorafgaande aan SCT worden bepaald. Zo kunnen mogelijke mHag specifieke immuun reacties na allogene SCT worden voorspeld. Een andere belangrijke eigenschap van mHags is dat ze een "differentiële weefselverdeling" hebben. Dit betekent dat sommige mHags breed tot expressie komen, bijvoorbeeld door alle cellen in het lichaam, terwijl andere slechts op hematopoïetische (zoals leukemie) of solide tumorcellen aanwezig zijn. Die brede mHags zijn geïdentificeerd als de belangrijkste in situ doelwitten van GvHD. De hematopoïese en solide tumor- specifieke mHags, zoals HA-1, geven de unieke mogelijkheid om de GvT effect verhogend zonder ernstige GvHD te induceren.

Er zijn twee manieren om mHag specifieke immunotherapie van kanker toe te passen. De ene is het toedienen van in vitro gegenereerde mHag specifieke CTL's (mHag CTL's). De andere is vaccinatie met peptiden van tumor mHag die de mHag CTL na allogene SCT een boost geven. Bij de start van dit proefschrift, ontbrak een *proof of concept* voor de antikanker werkzaamheid van mHag specifieke immunotherapie in vivo. Bovendien waren de optimale klinische parameters voor mHag specifieke immunotherapie onbekend en waren de mHag specifieke *immune escape* mechanismen van kanker niet geïdentificeerd. Daarnaast werden nieuwe methoden vereist voor de in vitro expansie van mHag CTL en

voor het ontwerp van mHag peptide vaccins. Tot slot waren de optimale parameters voor het klinisch begeleiden van mHags immunotherapie van kanker onbekend.

Dit proefschrift bestudeerde 1) de *proof of concept* voor de werkzaamheid van mHag specifieke immunotherapie in vitro en in vivo, 2) de optimale omstandigheden waaronder mHag CTL's het meest effectief zijn tegen leukemie en solide tumoren, 3) nieuwe *immune escape* mechanismen in kanker die in overweging moeten worden genomen voor de mHags als target antigenen, 4) de optimale protocollen voor de in vitro expansie van mHags CTL's, 5) het optimale ontwerp van mHag peptide vaccins en 6) de optimale parameters voor de klinische begeleiding van mHags specifieke immunotherapie van kanker.

Hoofdstuk 2-4 leveren de *proof of concept* dat HA-1 CTL's in staat zijn menselijke leukemie en solide tumoren in vitro en in vivo te elimineren. **Hoofdstuk 2** onderzoekt het antitumor effect van HA-1 CTL tegen menselijke leukemie in immunodeficiente muizen met een lage tumor dosis en in immunodeficiente muizen met een uitgebreide tumor ingroei. De HA-1 CTL verspreiden zich systemisch in alle organen en onderdrukken effectief de groei van de menselijke leukemie, in een zgn minimal disease setting, in vivo. Echter, het blijkt eveneens dat de HA-1 CTL na infusie snel uit de circulatie verdwijnen en dat groei van de al gevestigde leukemie niet wordt beïnvloed door infusie van CTL HA-1. **Hoofdstuk 3** beschrijft het ontwikkelen van een nieuwe test die het bestuderen van de in situ interactie van mHag CTL's met menselijke solide tumoren in vitro mogelijk maakt. In dit model worden de solide tumoren gegenereerd van tumor cellijnen in een collageen type I matrix in vitro; deze vertonen grote overeenkomst met de histologische kenmerken van de overeenkomstige klinische tumoren. Door het 3D kenmerk van deze in vitro tumoren kan bijvoorbeeld het niveau van tumorinfiltratie bepaald worden dat nodig is om menselijke tumoren te vernietigen. **Hoofdstuk 4** beschrijft de mogelijkheid en mHag specificiteit van HA-1 CTL om menselijke 3D microtumoren te vernietigen in vitro en het antitumor effect van HA-1 CTL in vivo. Infusie van HA-1 CTL in immunodeficiente muizen waarin menselijke borstkankercellen groeien, leidt tot infiltratie van menselijke 3D long metastasen en tot remming van kanker groei. Echter, de geïnfundeerde HA-1 CTL's infiltreren niet de subcutane macrotumoren. Hoewel de exacte redenen voor de lage HA-1 CTL infiltratie van grote bestaande solide tumoren onbekend blijven, geeft de samenvatting van de bevindingen van **Hoofdstuk 2-4** aan dat mHag specifieke immunotherapie van kanker het meest effectief zal zijn na maximale tumor reductie.

Hoofdstuk 5 en 6 onderzoeken de vraag welke mHag specifieke *immune escape* mechanismen in kanker moeten worden overwogen wanneer mHags als target antigenen worden gebruikt. **Hoofdstuk 5** laat zien dat chromosomale afwijkingen in leukemie cellen de mHag coderende genen kunnen vernietigen, en daarmee de herkenning van de leukemie cellen door mHag CTL's. **Hoofdstuk 6** beschrijft dat promotor methylering, een veel voorkomende chemische DNA-modificatie tijdens cancerogenese meestal geassocieerd met het afschakelen van genen, een rol speelt in het afschakelen van het HA-1-gen in HA-1 mRNA^{neg} solide tumorcellijnen. Het HA-1 promotorgebied is namelijk meestal gemethyleerd in HA-1^{neg} solide tumorcellijnen maar niet gemethyleerd in HA-1^{pos} solide tumor cellijnen, in normale niet-hematopoïetische en in hematopoïetische cellijnen. Bovendien blijkt dat toepassing van hypomethylerende drugs HA-1 expressie induceert in HA-1^{neg} tumorcellen en daarmee de herkenning door HA-1 specifieke cytotoxische lymfocyten in vitro. Dus **hoofdstuk 5 en 6** hebben chromosomale afwijkingen en HA-1 promotor methylatie als tot nu toe onbekende mechanismen

geïdentificeerd waarmee leukemie en solide tumoren cellen aan herkenning door mHag CTL's ontsnappen. Dus, informatie over het mHag karyotype, de HA-1 mRNA / eiwitexpressie status en de functionele HA-1 expressie op geïsoleerde kwaadaardige cellen is nodig voor het optimaal plannen van mHag specifieke immunotherapie voor de individuele patiënt.

Hoofdstuk 7 onderzoekt hoe de in vitro expansie van mHag CTL kan worden verbeterd zodat voldoende aantallen CTL kunnen worden gegenereerd voor adoptieve transfer in patiënten. Namelijk, herhaaldelijke in vitro stimulatie van mHag CTL resulteert gewoonlijk in progressieve CTL differentiatie, verlies van proliferatie activiteit en uiteindelijk CTL dood. Dit probleem is vooral evident tijdens de genetische modificatie van CTL's met retrovirale vectoren (dat wil zeggen "gentherapie"). Het is beschreven dat homeostatische cytokinen zoals IL-7 en IL-15 de proliferatieve activiteit van CTL handhaven. In **hoofdstuk 7**, zijn IL-7 en IL-15 toegevoegd aan de CTL kweken tijdens de genetische modificatie van T-cellen met een zelfmoord gen. Herhaalde stimulatie van de T-cellijnen met mHag peptide geladen dendritische cellen (DC) resulteert in genetisch gemodificeerde T-cellen met kenmerken van stamcellen, zoals T-cellen met hoge proliferatie en de mogelijkheid van differentiatie in sterk cytotoxische CTL's in vitro. T-cellen met deze eigenschappen zijn IL-7Ra positief. Deze gegevens laten zien dat homeostatische cytokines tijdens het in vitro kweken van mHag CTL's zouden kunnen helpen om grotere hoeveelheden mHag CTL's in vitro te expanderen. Bovendien zou de exploitatie van IL-7Ra als marker helpen om mHag CTL's met optimaal groei potentieel te selecteren.

Hoofdstuk 8 onderzoekt of HA-1 peptide vaccins worden verbeterd kunnen worden door het peptide langer te maken. Deze studie werd gebaseerd op studies in muizen met verschillen in de presentatie tussen de zogenaamde "lange peptiden" (LPs) (peptiden die de sequentie van het werkelijke HLA klasse I T-cel epitoom bevatten, maar aan beide uiteinden zijn verlengd) en de conventionele zogenaamde korte peptiden (SPs) (peptiden van precies het HLA klasse I T-cel epitoom van een antigeen). Er is namelijk beschreven dat LP presentatie meer beperkt is tot professionele APC's en met langere levensduur in vergelijking met de SPs. In de studie van **hoofdstuk 8**, is HA-1 LP presentatie, maar niet SP presentatie, grotendeels beperkt tot de geactiveerde DC's en bijna afwezig op andere hematopoietische cellen. Belangrijk is dat DC's de HA-1 LP 2-3 log niveau minder efficiënt presenteren dan de SP. Tot slot, het verval van HA-1 LP en SP presentatie op DCs is vergelijkbaar. Concluderend, HA-1 LPs en SPs verschillen in hun in vitro eigenschappen. Het blijft echter de vraag of HA-1 LPs vaccins zal leiden tot betere immuun reacties in vergelijking met SPs in klinische studies.

Hoofdstuk 9 onderzoekt hoe klinische reacties op HA-1 specifieke immunotherapie op eenzelfde manier kunnen worden bepaald bij verschillende ziekten. HA-1 komt namelijk tot expressie in vrijwel alle hematologische aandoeningen die gekenmerkt worden door verschillende ziekte-specifieke markers. **Hoofdstuk 9** beschrijft de relatie tussen de HA-1 CTL's in het perifere bloed en de kinetiek van het hematopoietische chimerisme van de transplantaat ontvanger gemeten op diverse tijdstippen na allogene HLA-gematchte HA-1 gemismatchte SCT. Het transplantaat ontvanger chimerisme is gemeten met behulp van een zeer gevoelige mHag specifieke kwantitatieve PCR. Functionele HA-1 CTL's zijn aantoonbaar in 6/10 patiënten en vertonen een omgekeerde correlatie tussen de aantallen HA-1 CTL en de hoogte van het hematopoietische chimerisme van de transplantaat ontvanger. Vice versa, hebben HA-1 CTL^{neg} patiënten langdurend hoge transplantaat ontvanger chimerisme niveaus. Co-incubatie van CD34

+ cellen met HA-1 CTL verhinderen grotendeels de humane hematopoietische *engraftment* in immunodeficiënte muizen. Deze gegevens geven aan dat therapeutisch boosten van HA-1 CTL het chimerisme van de transplantaat ontvanger onder controle houdt middels het elimineren van de ontvanger hematopoïese op stamcel niveau. Dus, het ontvanger chimerisme is een geschikte marker om de klinische reacties te bepalen voor HA-1 specifieke immunotherapie in verschillende ziekten.

Samenvattend, levert dit proefschrift de *proof of concept* voor de werkzaamheid in vitro en in vivo van mHag specifieke immunotherapie tegen leukemie en solide tumoren. HA-1 specifieke immunotherapie wordt het beste toegepast in een *minimal disease* situatie. Daarom is maximale tumor reductie met conventionele therapieën nodig voor een succesvolle mHag specifieke immunotherapie. *Immune escape* mechanismen in kanker moeten worden overwogen wanneer de mHags als target antigenen worden gebruikt. Dus moeten functionele testen de expressie van HA-1 op het oppervlakte van de kankercel bepalen voordat immunotherapie wordt gestart. In vitro expansie van mHags CTL voor adoptieve transfer van CTL wordt het beste uitgevoerd in aanwezigheid van homeostatische cytokines. Korte peptiden kunnen optimaal mHag peptide vaccins zijn. Tenslotte is chimerisme een optimale klinische parameter om de klinische respons op HA-1 specifieke immunotherapie bij verschillende ziekten te bepalen. De gegevens die in dit proefschrift zijn beschreven hebben relevante kennis verschaft die al gedeeltelijk geïmplementeerd is in het ontwerp van nieuwe HA-1 vaccinatie studies die gericht zijn op genezing van leukemie en solide tumoren.

