



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Control of cytomegalovirus viremia after T cell depleted allogeneic stem cell transplantation

Heiden, P.L.J. van der

### Citation

Heiden, P. L. J. van der. (2019, March 20). *Control of cytomegalovirus viremia after T cell depleted allogeneic stem cell transplantation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/70208>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/70208>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/70208> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Heiden, P.L.J. van der

**Title:** Control of cytomegalovirus viremia after T cell depleted allogeneic stem cell transplantation

**Issue Date:** 2019-03-20

# Chapter 10

**Nederlandse samenvatting**

## Nederlandse samenvatting

### Allogene stamceltransplantatie

De cellulaire componenten die samen het bloed vormen (erythrocyten, leukocyten en trombocyten) ontwikkelen zich uit stamcellen, een proces dat hematopoïese wordt genoemd. Bij verschillende kwaadaardige en niet-kwaadaardige hematologische aandoeningen is een hematopoïetische stamceltransplantatie dan ook een potentieel curatieve behandeling. Een hematopoïetische stamceltransplantatie kan worden verricht met lichaamseigen stamcellen (autologe stamceltransplantatie) of met lichaamsvreemde stamcellen (allogene stamceltransplantatie). In het geval van autologe stamceltransplantatie worden eigen stamcellen geogst en gebruikt om te kunnen herstellen na intensieve chemotherapie. Het doel van allogene stamceltransplantatie (alloSCT) is om hematopoïetische cellen van de patiënt inclusief de cellen die de ziekte dragen, te vervangen door hematopoïetische cellen van een gezonde donor.

Een alloSCT voor maligne hematologische aandoeningen kan worden overwogen indien de ziekte met chemotherapie onder controle is gebracht. Vervolgens moet er een geschikte donor gezocht worden. Om na alloSCT afstoting van het donor transplantaat te voorkomen is het van belang dat het Human Leucocyte Antigen (HLA) van donor en ontvanger voldoende overeenkomen. Een donor kan verwant of onverwant zijn aan de patiënt maar bij voorkeur zoveel mogelijk HLA gematcht. Om het aanslaan (engraftment) van donor stamcellen na alloSCT mogelijk te maken, is conditionering van de ontvanger met immuunsuppressiva en eventueel bestraling voorafgaand aan de alloSCT noodzakelijk. Deze conditionering leidt tot een periode van diepe beenmergdepressie met een hoge infectiegevoeligheid en transfusiebehoefte tot gevolg.

Hoewel de conditionering de hematopoïetische cellen van de ontvanger door chemotherapie en/of bestraling zoveel mogelijk verwijdert en onderdrukt om engraftment te faciliteren, is dit onvoldoende om een recidief van de ziekte na transplantatie te voorkomen. Dit blijkt uit het hoge risico op een recidief na autologe stamceltransplantatie bij acute leukemie. Genezing van de ziekte kan worden bereikt door een immunologische respons door alloreactieve T cellen van de donor. Deze alloreactieve T cellen kunnen resterende maligne cellen uitroeien wanneer de respons gericht is tegen hematopoïetische cellen van de ontvanger (graft versus leukemia, GVL). Echter wanneer de respons ook gericht is tegen niet-hematopoïetische cellen in weefsels en organen, kan potentieel fatale graft-versus-host ziekte (GVHD) ontstaan. GVL en GVHD worden beide veroorzaakt door alloreactieve T cel responsen. Deze alloreactiviteit kan ontstaan door verschillen tussen donor en ontvanger in HLA-moleculen maar ook door genetische verschillen die leiden tot andere presentatie van delen van eiwitten in HLA-moleculen. Indien een donor en ontvanger geheel genetisch identiek zijn, zoals bij HLA-identieke tweelingen, is er geen risico op GVHD maar kan er ook geen GVL effect ontstaan.

### **Preventie van GVHD door T cel depletie**

GVHD is de belangrijkste complicatie na alloSCT en kan leiden tot aanzienlijke morbiditeit en mortaliteit na alloSCT. De frequentie en ernst van GVHD kan worden verminderd door het gebruik van immuunsuppressiva of door het verwijderen van donor T cellen uit het transplantaat (T cel depletie). Zonder T cel depletie (TCD) moeten ontvangers langdurig behandeld worden met immuunsuppressie om GVHD te voorkomen. Immuunsuppressie is ook niet selectief en onderdrukt niet alleen de alloreactieve immuunresponsen die GVHD veroorzaken, maar ook potentieel gunstige immuunreacties zoals GVL of immuunreacties die nodig zijn voor bescherming tegen infecties.

Bij T cel depletie worden donor T cellen, waaronder alloreactieve T cellen verantwoordelijk voor het ontstaan van GVHD uit het transplantaat verwijderd. T cel depletie is effectief in het voorkomen van GVHD waardoor GVHD profylaxe met immuunsuppressie veelal niet nodig is. Het voorkomen van GVHD door TCD gaat echter gepaard met een verminderde kans op het ontstaan van een GVL respons. Om toch een GVL respons te ontwikkelen worden, in een later stadium, donor T cellen toegediend. Deze uitgestelde donor lymfocyten infusie (DLI) kan leiden tot controle van de ziekte met een kleiner risico op het ontstaan van GVHD.

TCD kan op verschillende manieren bereikt worden en de volledigheid van de depletie hangt af van de gekozen techniek. Bij CD34<sup>+</sup> selectie worden alleen stamcellen geselecteerd, leidend tot diepe T cel depletie. TCD kan ook verricht worden door depletende antistoffen aan het transplantaat toe te voegen. Alemtuzumab (Campath) is een monoclonaal antilichaam gericht tegen CD52, een marker die tot expressie komt op lymfocyten. Het toedienen van alemtuzumab aan het transplantaat dat daarna direct aan de patiënt toegediend wordt ("campath in de zak") is een goed toepasbare en tijdbesparende methode om TCD uit te voeren met een aangetoond laag risico op het ontwikkelen van GVHD. Hoewel TCD effectief is in het voorkomen van GVHD en langdurige immuunsuppressie na transplantatie over het algemeen niet nodig is, leidt TCD tot een periode van diepe en langdurige T cel deficiëntie. Gedurende deze periode lopen patiënten risico op het ontwikkelen van infectieuze complicaties, vooral door reactivaties van eerder doorgemaakte endogene herpesvirussen. Deze virussen worden in de normale situatie na infectie voortdurend onderdrukt door T cel immuniteit maar kunnen leiden tot klinische problemen bij reactivatie door het wegvallen van T cel controle door immuunsuppressie of TCD.

### **T cel immuniteit**

T cel immuniteit ontstaat door de ontwikkeling van antigeen-specifieke memory T cellen, die zich na een primaire immuunrespons ontwikkelen vanuit naïeve T cellen. T cellen worden onderverdeeld in CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cellen, waarbij CD4<sup>+</sup> T cellen belangrijk zijn voor het ontwikkelen en reguleren van immuunresponsen en CD8<sup>+</sup> T cellen belangrijk zijn in het elimineren van de pathogenen. CD4<sup>+</sup> T cellen herkennen delen van eiwitten (peptiden) gepresenteerd in HLA klasse II moleculen, die voornamelijk tot expressie worden gebracht door Antigeen Presenterende Cellen (APC), terwijl CD8<sup>+</sup> T cellen peptiden herkennen die

worden gepresenteerd in HLA klasse I moleculen welke tot expressie worden gebracht in alle weefsels. De inductie van een primaire T cel reactie leidt tot een snelle toename van effector CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cellen en de vorming van memory CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cellen die direct kunnen reageren op een nieuwe blootstelling aan het pathogeen. Voor het ontwikkelen van naïeve T cellen uit hematopoïetische stamcellen is de functie van de thymus van groot belang. Na de kindertijd raakt de thymus echter in regressie en neemt de functie sterk af. Het is niet duidelijk in welke mate na alloSCT de functie van de thymus noodzakelijk is om T cel immuniteit te herstellen.

Antigeen-specifieke T cellen kunnen op verschillende manieren geanalyseerd worden. CD8<sup>+</sup> T cellen specifiek voor een bepaald antigeen kunnen direct gevisualiseerd worden door binding met een kunstmatig HLA klasse I/peptide complex. Deze HLA/peptide complexen (tetrameren of pentameren, afhankelijk van het aantal gebruikte HLA moleculen) zijn voorzien van een fluorescerend label wat met flowcytometrie te detecteren is. T cellen kunnen ook geanalyseerd worden op basis van activatie. Na herkenning van een specifiek antigeen, produceren T cellen cytokinen, zoals interferon-gamma of interleukinen. De productie van deze cytokinen kan gemeten worden of direct gevisualiseerd worden. Functionele assays zijn geschikt om CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cellen te detecteren na antigene stimulatie. Deze antigene stimulatie kan een enkel peptide zijn, maar ook een combinatie van peptiden. Op deze manier kan een brede T cel respons tegen antigenen zoals virussen geanalyseerd worden.

### **Herpesvirus reactivaties na alloSCT**

T cel immuniteit is cruciaal om reactivatie van herpesvirussen zoals cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-virus (EBV) en varicella-zoster-virus (VZV) te controleren. Infecties met herpesvirussen komen veel voor in de algemene bevolking. Primaire infecties treden meestal op in de kindertijd en klinische symptomen zijn vaak mild of zelfs afwezig. Hoewel virus-specifieke T cellen massale replicatie kunnen voorkomen, worden herpesvirussen niet volledig geklaard en leiden ze tot latente infecties in hun gastheer. Deze latentie is het gevolg van een evenwicht tussen het virus en de virus-specifieke T cellen. In immunocompetente individuen zonder klinische symptomen kan het percentage van herpesvirus-specifieke T cellen oplopen tot wel 40% van het totaal aantal T cellen in het bloed. Dit hoge percentage ontstaat waarschijnlijk door recidiverende stimulatie van memory T cellen door subklinische reactivaties van het virus. Diepe en langdurige T cel deficiëntie na TCD alloSCT of immuunsuppressie verstoort de balans tussen T cel immuniteit en de herpes virussen en kan leiden tot mogelijk fatale CMV ziekte in geval van CMV reactivatie, Post Transplantatie Lymfoproliferatieve ziekte (PTLD) na EBV reactivatie of gedissemineerde herpes zoster bij VZV reactivatie.

### **Cytomegalovirus**

Ongeveer 60% van de westerse bevolking is geïnfecteerd met het cytomegalovirus. De infectie vindt meestal plaats in de kinderjaren. Het klinische beloop van CMV-infectie bij

immuuncompetente personen is mild en soms zelf geheel asymptomatisch. Een uitzondering is een primaire CMV infectie bij een zwangere vrouw waarbij de infectie tot neurologische afwijkingen bij het kind kan leiden. Na de primaire infectie persisteert CMV latent met name in monocyt en endotheelcellen. Bij immungecompromitteerde patiënten kan door het ontbreken of disfunctioneren van CMV-specifieke T cellen de CMV reactivatie leiden tot mogelijk fatale CMV-ziekte, zoals CMV pneumonitis, CMV colitis of CMV encefalitis.

Reactivatie van CMV is de meest voorkomende reactivatie van herpesvirussen na alloSCT met een incidentie van 80% bij CMV seropositieve ontvangers. Primaire CMV infectie van een CMV seronegatieve ontvanger via een stamceltransplantaat van een CMV seropositieve donor is mogelijk maar in mindere mate (slechts 10% van de CMV seronegatieve ontvangers ontwikkelt een CMV infectie middels een stamceltransplantaat van een CMV seropositieve donor). Dit komt waarschijnlijk omdat met name endotheelcellen, de belangrijkste cellen voor CMV latentie en persistentie, niet in grote getalen in het stamceltransplantaat aanwezig zijn.

Met PCR technieken is virale replicatie van CMV aan te tonen en te kwantificeren tijdens primaire infectie en reactivatie. Dit maakt het mogelijk om het beloop in de hoeveelheid CMV (viral load) te analyseren en te relateren aan de respons van de CMV-specifieke T cellen. Deze analyses hebben aangetoond dat CMV-specifieke T cel immuniteit essentieel is om CMV reactivatie te controleren en om CMV ziekte te voorkomen.

### **Epstein-Barr Virus**

Epstein-Barr Virus is een herpesvirus dat meer dan 90% van de westerse bevolking infecteert. Na primaire infectie, die kan leiden tot het klinische syndroom van infectieuze mononucleose, verblijft het virus latent in B cellen. Infectieuze mononucleose wordt veroorzaakt door een massale expansie van EBV-specifieke T cellen na herkenning van een deel van een EBV eiwit met als doel de EBV infectie te beheersen.

Na alloSCT kan reactivatie van EBV plaatsvinden door afwezigheid van voldoende EBV-specifieke T cellen. Met falende T cel controle kan het aantal EBV geïnfekteerde B cellen enorm toenemen, wat kan leiden tot potentieel fatale PTLD. Hoewel de incidentie van EBV-geassocieerde PTLD laag is na alloSCT (4%), correleert het risico met het niveau van TCD. Bij strategieën die alleen T cellen verwijderen neemt het risico toe omdat B cellen, de belangrijkste plaats voor EBV-latentie, niet zijn verwijderd. In TCD door middel van antilichamen die zich richten op het verwijderen van zowel T als B cellen, zoals alemtuzumab, is het risico op PTLD laag.

### **Varicella zoster virus**

Varicella zoster virus (VZV) is een herpesvirus dat ongeveer 95% van de bevolking infecteert. De primaire infectie met VZV leidt tot varicella (waterpokken). Na de primaire infectie verblijft VZV latent in neuronen en reactivatie leidt tot herpes zoster (gordelroos). Doordat zenuwcellen minder blootgesteld worden aan het immuunsysteem dan andere weefsels in het lichaam en omdat VZV minder frequent reactiveert vergeleken met CMV en EBV

worden VZV-specifieke memory T cellen niet herhaaldelijk gestimuleerd. Hierdoor neemt de frequentie van circulerende VZV-specifieke memory T cellen langzaam af in de loop der tijd. De afname van VZV-specifieke memory T cellen wordt versneld door de conditionering en/of TCD in het kader van alloSCT.

Na alloSCT veroorzaakt reactivatie van het virus aanzienlijke morbiditeit en is mogelijk fataal bij gedissemineerde ziekte. Meest voorkomende complicaties zijn postherpetische neuralgie en perifere neuropathie. Net als bij CMV en EBV is cellulaire immuniteit essentieel voor het controleren van een reactivatie van VZV. In tegenstelling tot CMV en EBV is er weinig bekend over VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel immuniteit omdat er voor VZV geen immunodominante HLA klasse I peptiden bekend zijn en daardoor HLA constructen voor analyse niet beschikbaar zijn. Eerdere studies met functionele assays tonen wel VZV-specifieke memory CD4<sup>+</sup> T cellen aan, maar VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen zijn alleen aantoonbaar na kweken. Het onvermogen om VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen direct ex vivo te detecteren, kan het gevolg zijn van de lage frequenties van VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen of van de lage gevoeligheid van de screeningsmethoden die worden gebruikt om CD8<sup>+</sup> T cellen te detecteren.

### **Preventie van CMV ziekte door antivirale medicatie**

Om CMV ziekte te voorkomen, moet een periode van ernstige T cel deficiëntie na (TCD) alloSCT worden overbrugd tot CMV-specifieke T cel immuniteit hersteld is. Tijdens een CMV reactivatie, voorafgaand aan de ontwikkeling van CMV ziekte en wanneer patiënten nog asymptomatisch zijn, is CMV-DNA aantoonbaar in het bloed. Door deze viral load routinematig na alloSCT te vervolgen middels kwantitatieve PCR technieken, is preventie van CMV ziekte met preëemptieve behandeling mogelijk. Hierbij wordt antivirale therapie gestart wanneer de viral load boven een vooraf bepaalde drempel komt.

Ganciclovir is een synthetisch nucleoside dat DNA-virussen remt, zoals herpesvirussen en in het bijzonder CMV. Ganciclovir is de gouden standaard voor de behandeling van CMV gerelateerde complicaties, maar heeft aanzienlijke bijwerkingen, waarvan beenmergdepressie de belangrijkste is. Bovendien heeft ganciclovir een slechte biologische beschikbaarheid, waardoor orale toediening niet mogelijk is en ziekenhuisopname vaak vereist is. Deze factoren maken het profylactisch gebruik van ganciclovir om CMV ziekte te voorkomen niet haalbaar. Valganciclovir is afgeleid van ganciclovir en kan wel oraal toegediend worden en is daarom geschikt voor preëemptieve poliklinische behandeling om CMV ziekte te voorkomen. Langdurig gebruik van valganciclovir is echter, net als ganciclovir geassocieerd met ernstige bijwerkingen en het ontwikkelen van resistentie.

### **CMV-specifieke T cel reconstitutie**

Ondanks preëemptieve antivirale medicatie is herstel van T cel immuniteit en reconstitutie van CMV-specifieke T cellen vereist voor de lange termijn controle van CMV reactivatie en preventie van CMV ziekte. Reconstitutie van CMV-specifieke T cellen kan het resultaat zijn van expansie van memory T cellen van de ontvanger die het conditioneringsregime



overleven of van donor memory T cellen die met het transplantaat worden overgedragen. Daarnaast kunnen CMV-specifieke T cellen ook ontstaan uit een primaire respons vanuit naïeve donor T cellen. Het is echter onduidelijk of deze naïeve donor T cellen direct uit het transplantaat komen of ontstaan uit hematopoïetische stamcellen gevolgd door verdere ontwikkeling in de thymus.

Verskillende factoren kunnen CMV-specifieke T cel reconstitutie beïnvloeden. Immunosuppressie voor de preventie of behandeling van GVHD na transplantatie kan de T cel reconstitutie nadelig beïnvloeden. CMV-specifieke T cel reconstitutie kan ook worden verstoord door eradicatie van T cellen van ontvanger door intensieve conditioneringsregimes voorafgaand aan alloSCT. Hiernaast speelt de CMV serostatus van de donor mogelijk ook een rol in CMV-specifieke T cel reconstitutie. Als CMV-specifieke T cellen van een CMV seropositieve donor de TCD kunnen overleven, zouden deze na transplantatie kunnen reconstitueren en bescherming tegen CMV ziekte kunnen bieden. Het transplantaat van een CMV seronegatieve donor bevat geen CMV-specifieke memory T cellen. Hierdoor zou de bescherming tegen CMV ziekte na TCD alloSCT dus door residuale CMV-specifieke T cellen van ontvanger moeten komen. Deze overgebleven CMV-specifieke T cellen van de ontvanger lopen echter het risico om verwijderd te worden door alloreactieve donor T cellen na alloSCT en/of DLI, waarna de patiënt mogelijk het risico loopt om CMV ziekte te ontwikkelen.

Het toedienen van ongeselecteerde donor T cellen kan een strategie zijn om T cel reconstitutie na alloSCT te verbeteren. Hoewel deze benadering effectief kan zijn bij het herstellen van antivirale T cel immuniteit, kan deze mogelijk fatale GVHD veroorzaken. Om het risico op het induceren van GVHD te minimaliseren en om gericht de CMV-specifieke T cel reconstitutie te verbeteren, kunnen CMV-specifieke T-cellen uit bloed van de donor worden geïsoleerd en overgedragen naar de ontvanger na alloSCT (CMV-specifieke Adoptive Cell Transfer, ACT). CMV-specifieke ACT kan worden gebruikt als een profylactische of preventieve behandeling om CMV ziekte te voorkomen of als behandeling voor CMV ziekte. ACT is het meest effectief in afwezigheid van immunosuppressie, zoals het geval is bij TCD alloSCT. ACT wordt nog niet standaard toegepast omdat er op dit moment nog onvoldoende gegevens beschikbaar zijn met betrekking op de veiligheid en de effectiviteit van deze behandeling.

## **Dit Proefschrift**

Ernstige T cel deficiëntie kan leiden tot reactivatie van endogene herpesvirussen na TCD alloSCT. Onvoldoende controle van deze virussen door virus-specifieke T cellen kan tot aanzienlijke complicaties leiden. Immuniteit op lange termijn hangt af van virus-specifieke T cel reconstitutie. Reactivatie van CMV is de meest voorkomende herpesvirus reactivatie na alloSCT. Ongeveer 60% van alloSCT-ontvangers zijn seropositief voor CMV en lopen daarom risico op endogene reactivatie van latente CMV. CMV reactivatie kan leiden tot mogelijk fatale

CMV ziekte, bestaande uit CMV pneumonitis, CMV colitis of CMV encefalitis. Het doel van dit proefschrift is om factoren te evalueren die de incidentie van CMV ziekte na TCD alloSCT beïnvloeden. Deze factoren omvatten het conditioneringsregime, CMV serostatus van de donor, farmacologische interventie na alloSCT en ACT voor behandeling van refractaire CMV reactivatie of CMV ziekte.

CMV ziekte kan worden voorkomen door het preëemptief behandelen van CMV reactivatie met behulp van intraveneus ganciclovir. In een preëemptieve behandelingsstrategie wordt met antivirale therapie begonnen wanneer de viral load boven een vooraf bepaalde PCR drempelwaarde ligt. Een effectieve orale behandeling voor preëemptieve CMV therapie zou de preventie en behandeling van CMV poliklinisch mogelijk maken en zou leiden tot een lagere belasting voor de patiënt en lagere kosten voor de gezondheidszorg. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat preëemptieve behandeling met oraal valganciclovir even effectief is bij het verminderen van de hoeveelheid circulerend virus (CMV viral load) na alloSCT in vergelijking met intraveneus ganciclovir. Ernstige bijwerkingen werden niet waargenomen en CMV ziekte trad niet op. Het percentage patiënten dat erythrocytentransfusies ontving, was hoger in de groep patiënten die ganciclovir kregen. Mogelijk was dit het resultaat van co-morbiditeit bij de opgenomen patiënten die intraveneus met ganciclovir werden behandeld. Preëemptieve behandeling van CMV reactivaties in allogene stamcelontvangers met valganciclovir of ganciclovir leidde tot een vergelijkbare mediane reductie van het CMV DNA in plasma van ongeveer 0,1 log<sub>10</sub> kopieën / ml / dag. We concludeerden dat oraal valganciclovir (900 mg, tweemaal daags) even effectief en veilig is als intraveneus ganciclovir (5 mg / kg, tweemaal daags) bij de behandeling van CMV reactivatie gericht op het voorkomen van CMV-ziekte na alloSCT. De overgrote meerderheid van alloSCT-ontvangers zonder symptomen van CMV ziekte wanneer de CMV reactivatie wordt gedetecteerd, heeft baat bij behandeling met een oraal geneesmiddel, zonder dat opname in het ziekenhuis noodzakelijk is. Voor patiënten met verdenking op symptomatische CMV reactivatie blijft intraveneus toegediend ganciclovir het eerste keuzegeneesmiddel, omdat het beloop van de CMV ziekte snel progressief en uiteindelijk fataal kan zijn.

Het is vastgesteld dat alloSCT met verminderde intensiteitsconditionering (Reduced Intensity Conditioning, RIC) met succes kan worden uitgevoerd bij individuen met een grote verscheidenheid aan hematologische ziekten en kan leiden tot een verminderd risico op transplantatie gerelateerde sterfte. Duurzame donor engraftment en gunstige respons van de ziekte zonder graft-versus-host ziekte (Graft versus Host Disease, GVHD) werd gemeld voor het in vitro TCD RIC alloSCT-protocol met fludarabine, anti-thymocyten globuline (ATG), busulphan en "Campath in de zak". Er kan worden verondersteld dat na RIC meer resterende T cellen van ontvanger het conditioneringsregime overleven en beschermende immuniteit na alloSCT kunnen verlenen. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat er geen significant verschil was in incidentie en ernst van CMV reactivaties binnen 100 dagen na alloSCT voorafgegaan door RIC in vergelijking met een conventionele conditionering (myeloablatieve conditionering, MAC). Het begin van detectie van CMV DNA in plasma na alloSCT, de duur van een CMV

reactivatie, de DNA piek load, het gebied onder de DNAemia-curve, het aantal en de duur van pre-emotieve CMV behandelingsperioden, evenals het aantal recidiverende infecties binnen 100 dagen na alloSCT waren vergelijkbaar na RIC en MAC. Deze vergelijkbare ernst van CMV reactivaties na RIC en MAC kan worden verklaard door de TCD aangezien dit in beide patiëntengroepen toegepast werd. Op zichzelf is TCD van het transplantaat geassocieerd met een verhoogd risico op CMV reactivaties, wat lijkt te worden weerspiegeld door de hoge incidentie van CMV reactivaties (51%) binnen 100 dagen na alloSCT in dit onderzoek. Omdat RIC de hematopoïetische cellen van de ontvanger relatief spaart, kan verwacht worden dat ontvangers die afhankelijk zijn van ontvanger CMV-specifieke T cellen het meeste baat hebben bij RIC in de controle van CMV reactivatie. CMV seropositieve ontvangers ( $R^+$ ) die getransplanteerd zijn met een CMV seronegatieve donor ( $R^-D^-$ ) zijn afhankelijk van resterende CMV-specifieke T cellen van de ontvanger, omdat het transplantaat van de donor geen memory CMV-specifieke T cellen bevat. In deze studie was er geen statistisch verschil in frequentie en ernst van CMV reactivatie aanwezig in  $R^-D^-$  patiënten in vergelijking met CMV seropositieve ontvangers getransplanteerd met een CMV seropositieve donor ( $R^-D^+$ ). Een niet-significante toename in frequentie en ernst van CMV reactivatie werd echter waargenomen bij  $R^-D^-$  patiënten in vergelijking met  $R^-D^+$  en zoals verwacht was dit verschil meer uitgesproken in MAC in vergelijking met RIC. Dit verschil bereikte echter geen statistische significantie vermoedelijk als gevolg van het kleine aantal patiënten en een korte follow-up van 100 dagen na alloSCT.

In **hoofdstuk 4** hebben we het effect onderzocht van de CMV serostatus van de donor op de incidentie van CMV ziekte na TCD alloSCT in een groter cohort van CMV seropositieve patiënten. CMV-specifieke T cellen kunnen met het transplantaat van CMV seropositieve donoren worden overgedragen en op die manier bescherming bieden tegen CMV ziekte. T cel depletie kan echter deze CMV-specifieke T cellen elimineren. Om het effect van CMV serostatus bij TCD alloSCT te bepalen, analyseerden we de incidentie van CMV ziekte bij 157 CMV seropositieve ontvangers, bestaande uit 51  $R^-D^-$  en 106  $R^-D^+$  patiënten. Daarnaast bepaalden we de oorsprong van CMV-specifieke T cellen in een selectie van 25  $R^-D^-$  patiënten om te bepalen of primaire CMV-specifieke T cel responsen konden worden aangetoond. De duur van CMV reactivaties en de incidentie van CMV ziekte waren hoger bij  $R^-D^-$  patiënten in vergelijking met  $R^-D^+$  patiënten. Bij  $R^-D^-$  patiënten waren CMV-specifieke  $CD4^+$  en  $CD8^+$  T cellen voornamelijk van ontvanger origine. Daar staat tegenover dat in 53% van de  $R^-D^-$  patiënten in het eerste jaar CMV-specifieke T cellen van donor origine werden gedetecteerd, zelfs al na 3 maanden na TCD alloSCT. We concluderen dat CMV serostatus de klinische ernst van CMV reactivaties significant beïnvloedde, wat de rol van CMV-specifieke memory T cellen die met het transplantaat werden overgedragen aangeeft, ondanks de uiteindelijke vorming van primaire CMV-specifieke T cel responsen bij  $R^-D^-$  patiënten.

Gezien de cruciale rol van CMV-specifieke T cellen bij het voorkomen van CMV ziekte, kan het verbeteren van CMV-specifieke T cel reconstitutie bij patiënten door ACT van CMV-specifieke T cellen een aantrekkelijke behandelingsmodaliteit zijn. Echter, vragen

met betrekking tot veiligheid en effectiviteit van het gebruik van ACT moeten nog steeds beantwoord worden. In **hoofdstuk 5** hebben we de veiligheid en effectiviteit van ACT om CMV-specifieke T cel immuniteit te herstellen geanalyseerd door een fase I/II klinisch onderzoek uit te voeren naar ACT van in vitro-gegenereerde CMV pp65-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellijnen. Deze cellijnen werden gegenereerd door perifere mononucleaire cellen van CMV seropositieve donoren of patiënten te stimuleren met HLA-A\*0201 en/of HLA-B\*0702 gereëstricteerde CMV-pp65 peptiden (NLV / TPR). Op dag 1 na stimulatie werd verrijkt door interferon-gamma producerende T cellen te isoleren met het CliniMACS Cytokine Capture System en te kweken met autologe feeders en lage dosis interleukine-2. Na 7-14 dagen kweken werden kwaliteitscontroles uitgevoerd en werden de CMV-specifieke T cellijnen toegediend of ingevroren. Vijftien CMV-specifieke T cellijnen werden gegenereerd, waarvan er 8 werden toegediend aan patiënten met refractaire CMV reactivatie. Zeven cellijnen werden gegenereerd maar niet toegediend omdat patiënten de CMV reactivatie inmiddels hadden geklaard tegen de tijd dat de cellijn geschikt was voor infusie (n = 4) of patiënten overleden waren door een recidief van de kwaadaardige ziekte (n = 1) of als gevolg van de progressieve CMV ziekte vóór infusie van de CMV-specifieke T cellen (n = 2). Na toediening werden geen acute bijwerkingen en geen GVHD waargenomen en daalden de CMV PCR loads. Bij verschillende patiënten was er een directe relatie tussen toediening van de T cellijn en het in vivo voorkomen van CMV-pp65-specifieke T cellen. Concluderend werd gevonden dat toediening van CMV-pp65-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellijnen mogelijk en veilig was.

In tegenstelling tot CMV is er weinig bekend over VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel immuniteit. Dit komt omdat er, anders dan bij CMV, geen gevalideerde van VZV afgeleide immunodominante peptiden voor HLA klasse I bekend zijn. Hierdoor wordt de analyse van VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel responsen belemmerd. In **hoofdstuk 6** beschrijven we onze zoektocht naar immunogene antigenen voor VZV om VZV-specifieke pentameren te ontwikkelen om VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen te identificeren. Potentiële HLA-A2 bindende peptiden van het Immediate Early (IE)-62 eiwit van VZV werden getest op binding met HLA-A2 en peptiden met voldoende bindingscapaciteit werden gebruikt voor het genereren van pentameren. Patiënten met VZV-reactivatie na TCD alloSCT werden gescreend met deze pentameren, wat leidde tot de identificatie van het eerste gevalideerde HLA klasse I gereëstricteerde epitoom van VZV. Bij 42% van de HLA-A2 positieve patiënten na VZV reactivatie konden deze IE62-ALW-HLA-A2-specifieke T cellen ex vivo worden gedetecteerd. We hebben aangetoond dat het ondanks de lage frequenties mogelijk is om VZV-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen te detecteren, waardoor ex vivo analyse van T cel responsen op VZV infectie en reactivatie en wellicht VZV vaccinatie mogelijk wordt.

Ondanks preëemptieve antivirale behandeling is de incidentie van CMV ziekte bij CMV seropositieve alloSCT patiënten nog steeds 10% 1 jaar na alloSCT. Dit illustreert de noodzaak van adequate CMV-specifieke T cel immuniteit voor langdurige controle van CMV en preventie van CMV ziekte. In **hoofdstuk 7** geven we een overzicht van factoren die relevant zijn voor de preventie van CMV ziekte na alloSCT. GVHD en het gebruik van een

onverwante of mismatch HLA donor bleken geassocieerd te zijn met een verhoogd risico op het ontwikkelen van CMV ziekte ondanks pre-emptieve antivirale behandeling, hetzij als gevolg van systemische immunosuppressie die nodig is om GVHD te voorkomen of te behandelen of als gevolg van eradicatie van memory CMV-specifieke T cellen van patiënt origine door de alloreactieve T cel respons van donor. T cel depletie bleek geassocieerd te zijn met een verhoogd risico op CMV reactivatie, maar niet met een verhoogd risico op CMV ziekte. Er kan worden verondersteld dat omdat immunosuppressie over het algemeen niet nodig is na TCD alloSCT, CMV-specifieke T cellen niet worden belemmerd om beschermende immuniteit te bieden in het geval van CMV-reactivatie. De CMV serostatus van de donor beïnvloedt de CMV-specifieke T cel reconstitutie en het risico op het ontwikkelen van CMV ziekte significant. De incidentie van aan CMV gerelateerde complicaties en mortaliteit is lager bij R<sup>+</sup>D<sup>+</sup> patiënten in vergelijking met R<sup>+</sup>D<sup>-</sup> patiënten. Bij R<sup>+</sup>D<sup>-</sup> patiënten zijn memory CMV-specifieke T cellen niet aanwezig in het donortransplantaat en de van ontvanger afkomstige virus-specifieke T cellen kunnen (gedeeltelijk) worden verwijderd door het conditioneringsregime en/of door een alloreactieve donor T cel reactie. Ten slotte hebben we de beschikbare onderzoeken naar de veiligheid en werkzaamheid van ACT van donor CMV-specifieke T cellen voor de preventie en behandeling van CMV ziekte na alloSCT onderzocht. Alle tot nu toe gepubliceerde trials zijn fase 1/2 trials, waarbij veiligheid, proof of concept en een associatie tussen ACT en klaring van CMV worden aangetoond. Een belangrijke beperking voor ACT na alloSCT is dat de behandeling van actieve GVHD met systemische immunosuppressie een uitsluitingscriterium was voor toediening van CMV-specifieke ACT in alle onderzoeken. Een andere belangrijke beperking van klinische toepasbaarheid van CMV-specifieke ACT is dat isolatie van CMV-specifieke memory T cellen van de donor beperkt is tot CMV seropositieve donoren. ACT van T cellen geïsoleerd van een andere donor dan de stamcel donor (third-party donor) kan een oplossing zijn voor R<sup>+</sup>D<sup>-</sup> patiënten. Trials tonen aan dat ACT met van een third-party donor afkomstige virus-specifieke T cellen mogelijk, veilig en effectief kan zijn bij de behandeling van persistente CMV-activatie en CMV-ziekte. Het persisteren van deze T cellen is echter onzeker.

Het doel van dit proefschrift was om factoren te evalueren die de incidentie van CMV ziekte na TCD alloSCT beïnvloeden. We hebben vastgesteld dat preventie van CMV ziekte veilig is met behulp van een pre-emptieve behandeling met oraal valganciclovir. We hebben geen effect op het risico aangetoond voor CMV reactivatie of CMV ziekte bij patiënten die werden behandeld met een RIC-regime en TCD alloSCT. GVHD en het gebruik van immunosuppressie na alloSCT bleken belangrijke risicofactoren te zijn voor de ontwikkeling van CMV ziekte. CMV specifieke T cel reconstitutie was efficiënter bij R<sup>+</sup>D<sup>+</sup> patiënten, wat leidt tot een verlaagd risico op het ontwikkelen van CMV ziekte. Van donor afkomstige CMV-specifieke primaire T cellen werden gedetecteerd in de meerderheid van de R<sup>+</sup>D<sup>-</sup> patiënten binnen een jaar na transplantatie.