



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Adoptive T cell therapy as treatment for Epstein Barr Virus-associated malignancies : strategies to enhance potential and broaden application

Straathof, K.C.M.

Citation

Straathof, K. C. M. (2006, September 28). *Adoptive T cell therapy as treatment for Epstein Barr Virus-associated malignancies : strategies to enhance potential and broaden application*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4579>

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/1887/4579>

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

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar adoptieve T-cel therapie als behandeling voor tumoren die geassocieerd zijn met het Epstein Barr virus (EBV) en strategieën om deze vorm van therapie te benutten voor andere tumoren die niet geassocieerd zijn met een virus.

Nasopharynxcarcinoom (NPC) is een tumor van de neusholte. Deze vorm van kanker is zeldzaam in Europa en Noord-Amerika, maar is een van de tien meest voorkomende tumoren in Zuidoost-Azië. Meer dan 90% van de NPCs van het ongedifferentieerde type zijn geassocieerd met het EBV wat suggereert dat infectie met dit virus een rol speelt in het ontstaan van deze tumoren. Daarnaast kunnen genetische factoren en omgevingsfactoren, zoals het eten van gezouten vis, aan dit proces bijdragen. Wanneer NPC wordt ontdekt in een vroeg stadium kan deze tumor effectief worden behandeld met bestraling en chemotherapie. Maar aangezien deze vorm van kanker aanvankelijk weinig of geen klachten geeft, is de ziekte vaak in een gevorderd stadium ten tijde van de diagnose. In deze latere tumorstadia is de genezingskans aanzienlijk geringer. Bovendien heeft bestraling in het nasopharynxgebied vaak ernstige bijwerkingen, waaronder het ontstaan van secundaire tumoren. Om deze redenen wordt gezocht naar een behandelingsstrategie die leidt tot de selectieve vernietiging van tumorcellen zonder aantasting van gezond weefsel. Een van de behandel mogelijkheden is immuuntherapie waarbij het afweersysteem wordt ingezet voor de vernietiging van tumorcellen.

Het afweersysteem heeft tot taak het lichaam te beschermen tegen schadelijke indringers, pathogenen, waaronder bacteriën en virussen. Dit beschermingssysteem bestaat uit verschillende componenten: het aangeboren afweersysteem dat een eerste verdediging vormt tegen pathogenen en het verkregen afweersysteem dat vervolgens een pathogeenspecifieke afweerreactie induceert. De hoofdcomponenten van het verkregen afweersysteem zijn B-cellen en T-cellen. Deze witte bloedcellen kunnen door middel van hun receptoren onderscheid maken tussen geïnfecteerde cellen en gezonde cellen. B-cellen herkennen eiwitten aan het oppervlak van geïnfecteerde cellen en produceren vervolgens antistoffen om deze onschadelijk te maken. T-cellen herkennen eiwitfragmenten (epitopen) die in de cel worden geproduceerd en vervolgens door moleculen van het major histocompatibility complex (MHC) aan het celoppervlak worden gepresenteerd. Deze MHC moleculen verschillen per individu zodat de virusepitopen die worden herkend door de T-cellen niet voor iedereen dezelfde zijn. Herkenning van virusepitopen resulteert in de activatie van twee typen T-cellen: cytotoxische T-cellen die de geïnfecteerde cellen doden en helper T-cellen die de immuunrespons coördineren. Een belangrijke eigenschap van dit verkregen afweersysteem is het geheugen wat ervoor zorgt dat, wanneer hetzelfde pathogeen opnieuw het lichaam binnen dringt, het afweersysteem snel en effectief kan ingrijpen.

Er zijn aanwijzingen dat tumorcellen, net als virusgeïnfecteerde cellen, verschillen van gezonde cellen afkomstig uit hetzelfde weefsel. Zo komen bepaalde eiwitten in tumorcellen in een gewijzigde vorm tot expressie. In andere tumoren komen eiwitten voor die normaal alleen in embryonaal weefsel aanwezig zijn. Een subgroep tumoren brengt eiwitten tot ex-

pressie afkomstig van een virus (bijvoorbeeld humaan papillomavirus in baarmoederhalskanker en EBV in bepaalde lymfekliertumoren en NPC). Ondanks deze verschillen tussen gezonde cellen en tumorcellen kunnen tumoren ontstaan en uitgroeien, zelfs in individuen met een normaal functionerend afweersysteem. Dit is vergelijkbaar met virussen die in een latente (slapende) vorm kunnen overleven in immuuncompetente individuen. Deze virussen hebben tijdens hun coëvolutie met het humane afweersysteem een reeks ontsnappingsmechanismen ontwikkeld om te kunnen overleven en zich te kunnen verspreiden. Tumoren beschikken over vergelijkbare mechanismen om herkenning van tumorcellen door het afweersysteem te verhinderen en de functie van de afweercellen te dempen.

Het aansporen van het afweersysteem tot een tumoreiwitspecifieke reactie kan deze barrières mogelijk wegnemen en leiden tot een effectieve vernietiging van de tumor. Activatie van het afweersysteem kan bereikt worden op tenminste twee manieren: (1) door middel van vaccinatie met tumor(geassocieerde)eiwitten, vergelijkbaar met vaccinatie ter bescherming tegen infectieziekten of (2) door buiten het lichaam tumorspecifieke T-cellen te selecteren en te vermenigvuldigen en deze volgens terug te brengen in de bloedbaan van de patiënt. Deze laatste strategie, adoptieve T-cel therapie, heeft als voordeel dat een tumorspecifieke immuunreactie wordt opgewekt in de ideale context (professionele antigeen presenterende cellen) en in een ideaal milieu (vrij van immuunsuppressieve stoffen die worden uitgescheiden door tumorcellen). Om deze redenen is adoptieve T-cel therapie gekozen als strategie om een nieuwe behandelingsmethode te ontwikkelen voor NPC.

NPC is een ideale kandidaat voor immuuntherapie aangezien de virale eiwitten die door de tumorcellen tot expressie worden gebracht, kunnen dienen als herkenningspunt voor het afweersysteem. Het merendeel van de bevolking is op de kinderleeftijd al in aanraking gekomen met EBV (het virus dat ook de ziekte van Pfeiffer veroorzaakt) en heeft derhalve EBV-specifieke T-cellen in het bloed. Eerder onderzoek in ons laboratorium heeft aangetoond dat EBV-specifieke T-cellen kunnen worden opgekweekt vanuit een kleine hoeveelheid bloed door middel van stimulatie met een B-cel lijn die is geïnfecteerd met EBV. Nadat de cellen zijn getest voor specificiteit en steriliteit kunnen deze vervolgens worden toegediend aan de patiënt. Deze strategie is al succesvol gebleken als preventie en behandeling voor EBV-geassocieerde lymfomen bij patiënten die een beenmergtransplantatie hebben ondergaan. Deze lymfomen brengen een reeks EBV-eiwitten tot expressie (waaronder EBV nucleus antigenen (EBNA)-3a, -3b en -3c) die een sterke T-cel reactie opwekken (EBV latentie type 3, figuur 1, hoofdstuk 1). Deze immunogene tumoren ontstaan dan ook alleen bij patiënten met een verminderde afweer zoals transplantatie- en HIV-geïnfecteerde patiënten. In andere EBV-geassocieerde tumoren zoals NPC en Hodgkin lymfoom (HL), die uitgroeien in individuen met een normaal functionerend immuunsysteem is het expressiepatroon van EBV-eiwitten beperkt tot de minder immunogene eiwitten EBNA1 en latent membraaneiwit (LMP)-1 en -2 (EBV latentie type 2). Desalniettemin kunnen deze minder immunogene EBV eiwitten worden gebruikt als tumorspecifieke antigenen voor immuuntherapie.

In het eerste deel van dit proefschrift worden de eerste stappen beschreven naar adoptieve T-cel therapie als behandeling voor EBV latentie type 2 tumoren, waaronder NPC. Allereerst werd de haalbaarheid bestudeerd van het opgroeien van EBV-specifieke T-cellen uit het bloed van patiënten met tumoren in gevorderd stadium (hoofdstuk 2). Ondanks voorafgaande behandeling met bestraling en chemotherapie konden EBV-specifieke T-cellen worden

opgekweekt voor alle patiënten. EBV-getransformeerde B-cellen werden gebruikt voor de reactivatie en vermenigvuldiging van T-cellen specifiek voor EBV antigenen waaronder LMP2. Door middel van een screeningstechniek met pools van LMP2 eiwitfragmenten werd aangetoond dat in het merendeel van de T-cellijnen cellen specifiek voor het tumorantigeen LMP2 aanwezig waren. Van de cellijn van elke patiënt werd in kaart gebracht welke LMP2 epitopen werden herkend. Tot op heden waren met name LMP2-epitopen gekarakteriseerd voor HLA-typen die veel voorkomen in West-Europa. Een groot deel van de NPC-patiënten in Noord-Amerika heeft echter een andere ethniciteit en derhalve vaak een HLA-type waarvoor nog geen epitopen beschikbaar zijn. Gebruikmakend van de T-cellijnen van deze patiënten werden LMP2-epitopen geïdentificeerd voor HLA-typen die algemeen voorkomen in Azië en Zuid-Amerika. Dit uitgebreide panel van LMP2-epitopen kan nu worden gebruikt om het aantal LMP2-specifieke T-cellen voor en na immunotherapie te bestuderen bij een brede patiëntengroep en zo inzicht te verkrijgen in het effect van de behandeling.

In een fase 1 klinische trial werden vervolgens 10 patiënten met NPC in een gevorderd stadium (3 of 4) behandeld met EBV-specifieke T-cellen (hoofdstuk 3). Van deze 10 patiënten waren 4 patiënten in remissie en 6 patiënten hadden een recidu of recidief tumor na behandeling met chemotherapie en bestraling. Adoptieve T-cel therapie was zonder bijwerkingen in 9 van de 10 patiënten. In 1 patiënt was adoptieve T-cel therapie geassocieerd met significante zwelling op de plaats van de tumor. Van de 6 patiënten met recidief/residu tumor tijdens van de T-cel behandelingen was er geen respons in 2 patiënten, stabilisatie van tumorgroei in 1 patiënt, een gedeeltelijke respons in 1 patiënt en een complete respons in 2 patiënten. Deze klinische responsen konden niet worden gecorreleerd met een toegenomen aantal LMP2-specifieke T-cellen in de bloedbaan. Dit kan mogelijk worden verklaard door een te lage gevoeligheid van de gebruikte detectietechniek voor tumorspecifieke T-cellen of doordat de geïnjecteerde T-cellen zich in de tumor bevonden en derhalve niet in de bloedbaan meetbaar waren.

Hoewel het resultaat van deze klinische trial bemoedigend was, zijn aanpassingen noodzakelijk om deze strategie succesvol te maken voor het merendeel van de patiënten. De effectiviteit van adoptieve T-cel therapie kan mogelijk worden verhoogd door het aantal geïnjecteerde T-cellen dat specifiek is voor een tumorantigeen, zoals LMP2, te vergroten. In hoofdstuk 4 wordt een techniek beschreven waarbij selectief LMP2-specifieke T-cellen worden opgekweekt in plaats van T-cellen die alle latente EBV-antigenen herkennen inclusief antigenen die niet in NPC tot expressie komen. In plaats van EBV-getransformeerde B-cellen werden nu dendritische cellen gebruikt die genetisch gemodificeerd waren zodat deze een hoge expressie hadden van het LMP2 antigeen. De geactiveerde LMP2-specifieke T-cellen werden vervolgens vermenigvuldigd door stimulatie met een EBV-geïnfecteerde B-cel lijn die LMP2 tot overexpressie brengt. Deze techniek wordt nu toegepast in een klinische trial voor adoptieve immunotherapie als behandeling voor EBV-positieve HL. Andere strategieën om de effectiviteit van adoptieve T-celtherapie te verbeteren worden besproken in hoofdstuk 8.

Helaas brengt maar een gering aantal tumoren virusantigenen tot expressie die gemakkelijk herkenbaar zijn voor het immuunsysteem. Om adoptieve immunotherapie ook toe te kunnen passen op andere niet-virus geassocieerde tumoren is het noodzakelijk om een

ethode te ontwikkelen voor het verkrijgen van een groot aantal T-cellen die specifiek zijn voor een tumorantigeen dat normaal geen of alleen een zwakke afweerreactie opwekt. Dit is het doel van het onderzoek beschreven in het tweede deel van dit proefschrift.

De antigeenspecificiteit van een T-cel wordt bepaald door de T-celreceptor (TCR). Een TCR bestaat uit extracellulaire en een intracellulaire componenten. De extracellulaire component herkent en bindt het antigeen (Figuur 3, hoofdstuk 1). De intracellulaire component zendt vervolgens signalen uit die zorgen dat de T-cel zich vermenigvuldigt, de targetcel doodt en activerende stoffen (cytokinen) uitscheidt. Uit een T-cel met de gewenste specificiteit kan de TCR worden geïsoleerd en deze kan vervolgens door middel van gentransfer tot expressie worden gebracht in andere T-cellen. Deze gemodificeerde T-cellen verkrijgen dan dezelfde specificiteit als de T-cel waarvan de TCR afkomstig is. Op een vergelijkbare wijze kan de specificiteit van een antilichaam worden overgebracht op een T-cel. Het antigeenherkenningsdomein van een TCR wordt dan vervangen door het antigeenherkenningsdomein van een antilichaam. De resulterende chimère receptor combineert de specificiteit van een antilichaam met de effectorfuncties van een T-cel. Door middel van gentransfer kan dus, wanneer eenmalig een receptor of antilichaam met de gewenste tumorspecificiteit is geïsoleerd, een groot aantal tumorspecifieke T-cellen worden verkregen.

Hoewel deze techniek in theorie aantrekkelijk is, zijn er een aantal moeilijkheden die succesvolle toepassing in klinische studies tot nu toe hebben verhinderd. Ten eerste moet het niveau van expressie van de nieuw geïntroduceerde (transgene) antigeenreceptor vergelijkbaar of groter zijn dan dat van de TCRs die al op de T-cel aanwezig waren om een functionele herkenning van het gewenste antigeen te verkrijgen. Dit vereist de ontwikkeling van een techniek voor genetische modificatie die is geoptimaliseerd voor toepassing in humane T-cellen.

Ten tweede is reeds aangetoond dat antigeenherkenning door de T-cel alleen niet voldoende is voor eliminatie van tumorcellen. Aanvullende signalen via costimulatie moleculen zijn noodzakelijk voor een effectieve T-cel reactie. In afwezigheid van zulke costimulatiesignalen kan antigeenherkenning leiden tot tolerantie voor het tumorantigeen in plaats van eliminatie van de tumorcellen. Costimulatiemoleculen zijn vaak afwezig op tumorcellen en dit is mogelijk een van de mechanismen waarmee tumoren aan het afweersysteem kunnen ontsnappen. Door costimulatiesignalen in te bouwen in de tumorspecifieke TCR kan deze ontsnappingsroute mogelijk worden geblokkeerd en een effectieve immunoreactie tegen de tumor worden opgewekt.

Tenslotte, om zulke gemodificeerde T-cellen te kunnen gebruiken als behandeling voor patiënten is het gewenst om over een veiligheidssysteem te beschikken. In geval van bijwerkingen kunnen de toegediende cellen dan worden uitgeschakeld. Dit kan worden bereikt door samen met de transgene TCR een veiligheidsgen in te bouwen. In geval van toxiciteit kan dit gen worden geactiveerd. Dit resulteert dan in de zelfdestructie van de toegediende cellen. Een reeds beschikbaar veiligheidsgen is afkomstig van het herpes simplex virus. Dit systeem heeft echter als nadeel dat de cellen getransduceerd met dit viruseiwit als geïnfecteerd worden herkend door het afweersysteem. De getransduceerde cellen worden vervolgens opgeruimd door het afweersysteem wat een langdurig effect van immunotherapie in

de weg staat. Het is daarom noodzakelijk om een veiligheidsgen te ontwikkelen dat bestaat uit uitsluitend humane componenten om een afweerreactie gericht tegen de gemodificeerde cellen te voorkomen.

Deze stappen naar de klinische toepassing van transgene TCRs in adoptieve immunotherapie vormen het uitgangspunt van het tweede deel van dit proefschrift. In hoofdstuk 5 wordt beschreven hoe functionele expressie van een transgene tumorspecifieke TCR kan worden verkregen door middel van een geïmproveerde techniek voor het introduceren van een nieuw gen in humane T-cellen. Voor dit onderzoek is het minor histocompatibiliteitsantigeen HA-1 gebruikt als modeltumorantigeen. HA-1 antigeenspecifieke T-cellen hebben een reeds aangetoonde rol in de eliminatie van recidief leukemieën bij patiënten die een beenmergtransplantatie hebben ondergaan. T-cellen getransduceerd met een HA-1 antigeenspecifieke TCR met behulp van deze vernieuwde methode herkenden en doodden niet alleen cellen geladen met het relevante epitoom maar ook B-cellen die het antigeen op natuurlijke wijze tot expressie brengen. Deze techniek voor genetische modificatie vergemakkelijkt de productie van grote aantallen van zulke therapeutische T-cellen.

Vervolgens werd bestudeerd of door het inbouwen van verschillende costimulatiemoleculen in een TCR de gemodificeerde T-cellen kunnen worden voorzien van de noodzakelijke signalen voor een effectieve afweerreactie (hoofdstuk 6). Voor deze studies werd gebruik gemaakt van een chimère TCR afgeleid van een tumorantigeen specifiek antilichaam. De basale TCR zonder ingebouwde costimulatiemoleculen was voldoende voor de doding van de tumorcellen. Vermenigvuldiging van de tumorspecifieke T-cellen en uitscheiding van afweersysteem activerende stoffen, vereist voor een langdurige afweerreactie, kon echter alleen worden geïnduceerd in de aanwezigheid van de costimulatiemoleculen CD28 en OX40. Dus door het inbouwen van essentiële activatiemoleculen in de TCR kan een effectieve afweerreactie in gang worden gezet en de afwezigheid van deze factoren op de tumorcel worden omzeild.

Tenslotte is in hoofdstuk 7 de ontwikkeling beschreven van een veiligheidsgen gebaseerd op caspase 9, een humaan molecuul dat een centrale rol speelt in de het proces van celdood (apoptose). Caspase 9 werd gefuseerd met een bindingsdomein voor een synthetisch molecuul (AP20187) zodat een induceerbare vorm van caspase 9 ontstond. Door toediening van AP20187 vormden twee induceerbare caspase 9 moleculen een complex wat leidde tot hun activatie en het in gang zetten van het proces van celdood. Dit veiligheidsmolecuul kon tot expressie worden gebracht in humane EBV-specifieke T-cellen zonder te interfereren met hun normale functie en antigeenspecificiteit. Activatie van induceerbaar caspase 9 leidde, wanneer het tot expressie werd gebracht boven een drempelniveau, tot doding van nagenoeg alle getransduceerde T-cellen. Dit veiligheidsgen kan bijdragen aan een snelle klinische evaluatie van verbeterde adoptieve immunotherapie strategieën, waaronder deze als voorgesteld in dit proefschrift.