



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Risks and potential benefits of adoptively transferred virus-specific T cells

Huisman, W.

Citation

Huisman, W. (2024, February 1). *Risks and potential benefits of adoptively transferred virus-specific T cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3715887>

Version: 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/1887/3715887>

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

A D D E N D U M

Nederlandse samenvatting

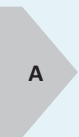
Abbreviations

List of publications and conference
presentations

Curriculum vitae

Dankwoord

A



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Immuungecompromitteerde patiënten en virale infecties

Virussen zijn pathogenen die een gastheercel nodig hebben om te reproduceren. Afhankelijk van het type virus worden virusdeeltjes verspreid wanneer de gastheercel doodgaat of wanneer virusdeeltjes de gastheercel verlaten zonder deze dood te maken. De antivirale immuunrespons die dan volgt, kan opgedeeld worden in een vroege niet-specifieke fase en een antigen-specifieke fase waarbij T en B cellen een belangrijke rol spelen. B cellen differentiëren in plasmacellen en produceren virus-specifieke antilichamen die vrije virusdeeltjes kunnen herkennen en neutraliseren. T cellen kunnen daarentegen virusdeeltjes herkennen die gepresenteerd worden op het oppervlak van virus-geïnfecteerde cellen. Deze vorm van immuniteit is beperkt functioneel of zelfs afwezig bij immuungecompromitteerde patiënten. Bijvoorbeeld bij patiënten die een allogene stamceltransplantatie (alloSCT) hebben ondergaan voor de behandeling van een hematologische maligniteit. De grootste uitdaging in het veld van alloSCT is een balans vinden tussen het optreden van het gunstige graft versus leukemia (GVL; transplantaat versus leukemie) effect en graft versus host disease (GvHD; transplantaat versus gastheer ziekte). Bij GvHD worden weefsels zoals de darmen, lever, longen of huid van de patiënt aangevallen door T cellen van de donor. Strategieën om GvHD tegen te gaan, bestaan uit het geven van immunosuppressieve medicatie of het verwijderen van donor T cellen uit het stamceltransplantaat. Deze T cellen kunnen dan op een later moment alsnog gegeven worden om het GVL effect te bewerkstelligen. Deze strategieën leiden allebei tot een tijdelijk gecompromitteerde immuniteit, waardoor virale infecties niet goed onder controle kunnen worden gehouden. De virale pathogenen die de meeste complicaties geven in patiënten na alloSCT, zijn cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) en humaan Adenovirus (AdV). Deze virussen kunnen persisteren in gastheercellen na de eerste infectie en kunnen op een later moment reactiveren vanuit hun latente fase.

Controle van virus reactivatie in immuungecompromitteerde patiënten

CMV, EBV en AdV zijn virussen die na primaire infectie latent aanwezig kunnen blijven in verschillende type cellen. Ook in gezonde individuen worden deze virussen niet volledig opgeruimd, maar worden ze wel onder controle gehouden door de antivirale T cellen. Bij immuungecompromitteerde patiënten zorgen CMV, EBV en AdV wel frequent voor problemen, omdat functionele antivirale T cellen onvoldoende aanwezig zijn, terwijl deze virussen nog wel latent aanwezig zijn. Antivirale medicatie zoals ganciclovir, foscarnet, cidofovir en letermovir kunnen worden gebruikt om de virus replicatie te remmen. Deze middelen hebben echter alleen een tijdelijk effect en moeten herhaaldelijk worden toegediend. Het komt in sommige gevallen ook voor dat patiënten niet meer reageren op deze medicatie. Aangezien het herstel van virus-specifieke T cellen na allo-

SCT noodzakelijk is voor adequate controle van virale infecties, is het overbrengen van functionele virus-specifieke T cellen van de stamceldonor naar de ontvanger/patiënt een aantrekkelijke strategie om de antivirale immuniteit sneller terug te krijgen in patiënten na alloSCT. Als de stamceldonor in het verleden in contact is gekomen met deze virussen, heeft het immuunsysteem van de stamceldonor een adequate antivirale immuniteit opgebouwd. De aanwezige virus-specifieke T cellen van de donor van de oorspronkelijke stamceltransplantatie kunnen dan geselecteerd worden uit perifeer bloed van de donor. Er zijn inmiddels verschillende manieren om deze T cellen te selecteren, waarbij de resultaten van een aantal exploratieve klinische studies laten zien dat deze cellen veilig toegediend kunnen worden aan de betreffende patiënt zonder ontwikkeling van GvHD. Daarnaast werden na toediening van de geselecteerde donor T cellen aan de patiënt toegenomen frequenties van virus-specifieke T cellen waargenomen in perifeer bloed van de ontvanger/patiënt. Deze strategie kan echter alleen reproduceerbaar worden uitgevoerd wanneer de stamceldonor ooit eerder in contact is geweest met het virus, gemeten door aanwezige antistoffen in het bloed (seropositief), en daardoor geheugen T cellen gericht tegen dit virus heeft gegenereerd.

Wanneer een stamceldonor dus niet eerder in contact is geweest met het virus, kunnen er niet reproduceerbaar virus-specifieke T cellen geïsoleerd worden. Een andere vervangende stamceldonor die wel seropositief is, is vaak niet makkelijk vindbaar. De zoektocht naar een geschikte stamceldonor begint namelijk met de vergelijking van de humane leukocyten antigenen (HLA) typering van de patiënt en de potentiële stamceldonoren. Doordat deze HLA moleculen polymorf zijn, en daardoor grotendeels heel verschillend zijn tussen individuen, is het moeilijk om een match tussen stamceldonor en patiënt te vinden. Deze HLA moleculen komen tot expressie op het oppervlakte van cellen en zijn verantwoordelijk voor de presentatie van peptiden (antigenen) die door T cellen kunnen worden herkend. Voordat T cellen deze peptiden in HLA moleculen kunnen herkennen, worden T cellen opgeleid in een klier die de zwezerik (thymus) genoemd wordt. Tijdens deze thymus-selectie, worden T cellen die in staat zijn peptiden net genoeg te herkennen in de context van het eigen (autoloog) HLA geselecteerd en “vrijgegeven” in het bloed. T cellen die peptiden in eigen HLA te sterk of helemaal niet herkennen, worden verwijderd. Belangrijk hierbij is dat T cellen die vreemd (allogeen; allo) HLA goed zouden kunnen herkennen niet onderworpen worden aan dit selectieproces, omdat deze vreemde HLA moleculen niet tot expressie komen in de eigen thymus. De receptor waarmee T cellen het gepresenteerde peptide kunnen herkennen in een HLA molecuul, heet de T-cel receptor (TCR).

Indien virus-specifieke T cellen niet uit de eigen stamceldonor geïsoleerd kunnen worden, kan er worden gezocht naar een andere geschikte seropositieve gezonde donor (derde partij). Een mogelijke bron voor gezonde seropositieve donoren is de bloedbank.

Donoren van deze derde partij kunnen dan gebruikt worden om virus-specifieke T cellen uit het bloed te isoleren en toe te dienen aan de patiënt, waardoor de antivirale immuniteit in de patiënt hersteld kan worden. Deze derde partij donor zal alleen grotendeels niet gematcht zijn voor de HLA moleculen van patiënt en/of stamceldonor.

Ongewenste reactiviteit door gedeeltelijke HLA match

Gedeeltelijke HLA match tussen patiënt, stamceldonor en de derde partij donor kan leiden tot ongewenste reactiviteit van T cellen van de derde partij donor gericht tegen cellen van de patiënt en/of de stamceldonor, die HLA moleculen tot expressie brengen die vreemd (allogeen) zijn voor de T cellen van de derde partij donor. Andersom kunnen de T cellen van de stamceldonor het virus-specifieke T-cel transplantaat van de derde partij donor afstoten waardoor er geen ongewenste reactiviteit kan plaatsvinden, maar ook geen adequate controle van de virale reactivatie. In allebei de gevallen is er geen thymus selectie geweest van de allogene HLA moleculen. Virus-specifieke T cellen afkomstig van een derde partij donor herkennen met hun TCR een viraal antigen in de context van het autologe HLA, maar wanneer diezelfde TCR een ander peptide herkent in de context van het allogene HLA, dan kan dit leiden tot ongewenste reactiviteit in de vorm van GVHD of transplantaatafstoting. Deze vorm van ongewenste reactiviteit wordt ook wel allo-HLA kruis-activiteit genoemd. Wanneer virus-specifieke T cellen van een derde partij donor niet voldoende HLA gematcht worden met de patiënt, kan dit dus tot allo-HLA kruis-activiteit leiden. Als we zouden kunnen voorspellen welke allogene HLA moleculen herkend kunnen worden door virus-specifieke T cellen bij een gedeeltelijke HLA match, kunnen we specifieke donoren, virus-specifieke T-cel populaties of TCRs selecteren met een minimaal risico op allo-HLA kruis-activiteit.

Dit proefschrift

Het onderzoek in dit proefschrift was gefocust op de opties die gebruikt kunnen worden om virale reactivaties onder controle te houden in immuungecompromitteerde patiënten door middel van toediening van virus-specifieke T cellen of genetische introductie van virus-specifieke TCRs en de risico's die daarmee gepaard gaan.

Om de effectiviteit te verklaren van virus-specifieke T cellen afkomstig van stamceldonoren, is het van belang om het lot van de toegediende virus-specifieke T cellen in de patiënt te bepalen. Voorheen was het alleen moeilijk om de toegediende virus-specifieke donor T cellen te onderscheiden van T cellen afkomstig van de patiënt of van donor T cellen uit het stamceltransplantaat die de conditionering hebben overleefd. In **hoofdstuk 2** hebben we van virus-specifieke T cellen afkomstig van stamceldonoren (T-cel producten) de sequenties van de TCRs van alle individuele virus-specifieke T-cel populaties achterhaald en daarmee deze T cellen kunnen traceren in het bloed van de individuele patiënten na toediening van deze T-cel producten. Met behulp van de

sequenties van de TCRs konden we onderscheid maken tussen virus-specifieke T cellen die alleen afkomstig waren uit het T-cel product, T cellen afkomstig van de patiënt, of T cellen die al aanwezig waren voor toediening van het virus-specifieke T-cel product (T cellen uit het stamceltransplantaat). De expansie van virus-specifieke T cellen tijdens een virale reactivatie verliep met eenzelfde kinetiek voor T cellen die exclusief afkomstig waren uit het toegediende T-cel product als voor virus-specifieke T cellen die al aanwezig waren in de patiënt voorafgaand aan de infusie van het virus-specifieke T-cel product. Daarnaast hebben we kunnen aantonen dat virus-specifieke T cellen die exclusief afkomstig waren uit het virus-specifieke T-cel product, ook konden persisteren in afwezigheid van een virale reactivatie.

In sommige situaties kunnen geheugen virus-specifieke T cellen niet geïsoleerd worden uit perifere bloed van de stamceldonor. Bijvoorbeeld wanneer de stamceldonor de virusinfectie niet eerder heeft doorgemaakt (seronegatief). Voor patiënten met een seronegatieve stamceldonor, zou een virus-seropositieve derde partij donor een snelle interventie mogelijk maken om de antivirale immuniteit te herstellen door middel van infusie van derde partij donor afkomstige virus-specifieke geheugen T cellen. Echter, T-cel producten van een derde partij zijn over het algemeen slechts gedeeltelijk HLA gematcht met de patiënt. De virus-specifieke T cellen van een derde partij donor zullen dus een andere opmaak van HLA moleculen hebben (HLA typering) ten opzichte van de patiënt. De HLA typering classificeert HLA-klasse-I moleculen HLA-A, -B en -C en HLA-klasse-II moleculen HLA-DR, -DQ- en -DP. Uiteindelijk kunnen er 12 verschillende HLA moleculen tot expressie komen per individu. De virus-specifieke T cellen van de derde partij donor moeten op zijn minst voor 1 van de 12 mogelijke HLA moleculen gematcht zijn met de patiënt, anders kunnen de virus-specifieke T cellen geen virus-geïnfecteerde cellen opruimen, aangezien deze de virale peptide zullen presenteren in autoloog HLA. In **hoofdstuk 3** hebben we virus-specifieke T cellen van gezonde donoren geïsoleerd en getest om te onderzoeken of de virus-specificiteit, HLA restrictie en/of HLA typering van de T cellen bepalende factoren waren om het risico op allo-HLA kruis-activiteit te kunnen voorspellen. Om de allo-HLA kruis-activiteit te testen werden de virus-specifieke T cellen *in vitro* gestimuleerd met getransformeerde onsterfelijke cellijnen (EBV-LCLs) van 24 verschillende individuen. Deze individuen waren zo uitgekozen dat deze in totaal 116 verschillende allogene HLA moleculen tot expressie brengen. Vervolgens gebruikten we HLA-klasse-I/II negatieve K562 cellen om HLA allelen van interesse middels genetische modificatie te introduceren. Met 40 verschillende genetisch aangepaste K562 cellijnen waarbij elke cellijn 1 specifiek HLA molecuul tot expressie bracht, konden we bevestigen welke HLA moleculen herkend werden bij de allo-HLA kruis-activiteit tegen de EBV-LCLs. HLA-B*08:01-gerestricteerde virus-specifieke T cellen lieten de hoogste frequentie en diversiteit van allo-HLA kruis-activiteit zien, onafhankelijk van hun virus-specificiteit. De allo-HLA kruis-activiteit was voornamelijk gericht tegen een specifieke

groep van allogene HLA-B moleculen. Door heterozygote donoren te selecteren die naast HLA-B*08:01 ook positief waren voor 1 van deze allogene HLA-B moleculen, bewezen we dat de frequentie en diversiteit van HLA-B*08:01-gerestricteerde virus-specifieke T cellen dan significant lager werd. De thymus selectie in deze heterozygote donoren heeft ervoor gezorgd dat deze allo-HLA kruis-reactieve virus-specifieke T cellen verwijderd werden. Daarentegen waren HLA-B*08:01-gerestricteerde virus-specifieke T cellen van heterozygote donoren die naast HLA-B*08:01 ook positief waren voor een allogeen HLA-B molecuul die niet herkend werd, nog steeds in dezelfde mate allo-HLA kruis reactief tegen een grote groep van allogene HLA-B moleculen. Deze resultaten lieten zien dat de frequentie, diversiteit en specificiteit van allo-HLA kruis-activiteit wetmatigheden volgen.

Het selectief verrijken voor T cellen met een TCR, die beperkte of geen allo-HLA kruis-activiteit laat zien, zou een andere optie zijn om het risico van ongewenste activiteit te verminderen van T-cel producten afkomstig van een derde partij donor. In een ideale setting, zouden virus-specifieke T cellen gebruikt kunnen worden met TCRs die veelvoorkomend zijn en in verschillende individuen te vinden zijn. De kans dat dit soort virus-specifieke T cellen allo-HLA kruis reactief zijn tegen een grote groep van allogene HLA moleculen is dan namelijk klein. Dit soort TCRs worden ook wel public TCRs genoemd. Om die reden hebben we in **hoofdstuk 4** de TCR repertoires van CMV, EBV en AdV-specifieke T cellen van gezonde individuen kwantitatief onderzocht. Hierbij is de prevalentie van een public TCR en TCRs die daar sterk op lijken binnen de groep van gezonde individuen bestudeerd. Daarnaast is er gekeken naar de frequentie van een public TCR en TCRs die daar sterk op lijken binnen ieder individu. Bijna 1/3 van alle CMV, EBV en AdV-specifieke TCR nucleotide sequenties konden vertaald worden naar een public TCR aminozuur sequentie. Daarbovenop had 12% van de TCRs een sterk vergelijkbare sequentie die maximaal 3 aminozuren verschilden. We lieten in dit onderzoek zien dat deze public TCRs en sterk vergelijkbare TCRs structureel gerelateerd waren en een gedeeld motief hadden in de TCR sequentie. Gecombineerd kwamen deze public TCRs en sterk vergelijkbare TCRs in meer dan 50% binnen de groep van gezonde individuen voor en de frequentie binnen een virus-specifieke T-cel populatie was meer dan 10%. We concludeerden dat de bijdrage van public TCRs en sterk vergelijkbare TCRs een groot aandeel had in virus-specifieke T-cel responsen. Dit soort TCRs zouden gebruikt kunnen worden als diagnostische tool of als toekomstig therapeutisch middel door de genetische code van deze TCRs te introduceren in immuun cellen om virale reactivaties onder controle te houden in immuungecompromitteerde patiënten.

In **hoofdstuk 4** werden frequent TCRs gevonden die sterk vergelijkbaar waren met public TCRs, maar waarbij alleen kleine variaties van aminozuren gevonden werden op specifieke posities in de TCR sequentie. Het bleef echter onduidelijk wat de toegestane

mogelijkheden/'vrijheid' van verschillende aminozuren (20 verschillende) waren op deze specifieke posities en wat dat voor invloed had op de specificiteit. Om te onderzoeken of de diversiteit van de verschillende aminozuren op een positie met grote variatie invloed had op de specificiteit, hebben we **in hoofdstuk 5** een HLA-A*02:01-gerestricteerde EBV-specifieke public TCR als model gebruikt en daarbij systematisch het aminozuur op positie 5 van de Complementary Determining Region 3 (CDR3) vervangen voor alle 20 mogelijke aminozuren. We hebben laten zien dat de aminozuren op die positie van de TCR volledig vervangbaar waren voor elk van de 20 aminozuren, zonder verlies van TCR functie en specificiteit. De reden waarom sommige varianten niet eerder gevonden werden in het T-cel repertoire van gezonde individuen kon verklaard worden door de verminderde kans om die sequenties te maken tijdens het generen van die TCR sequenties in de thymus in plaats van beperkingen in binding.

Voor patiënten met een seronegatieve stamcel donor zou de antivirale immuniteit snel hersteld kunnen worden door middel van infusie van derde partij donor afkomstige virus-specifieke geheugen T cellen. Deze strategie zou ook gebruikt kunnen worden voor patiënten met virus-geassocieerde maligniteiten, zoals EBV-geassocieerde maligniteiten, waarbij EBV antigenen zoals LMP1 of LMP2 hoog tot expressie komen. Virus-specifieke T cellen gericht tegen deze antigenen zijn echter in kleine getallen aanwezig of nog niet eerder gedetecteerd binnen bepaalde HLA restricties, zoals bijvoorbeeld HLA-A*01:01. Dit maakt het lastig om LMP1 en/of LMP2-specifieke virus-specifieke T cellen te isoleren en direct toe te dienen bij deze patiënten. Een alternatief zou zijn om de genetische code van LMP1 en/of LMP2 virus-specifieke TCRs te introduceren in T cellen van een donor. Patiënten die HLA-A*01:01 positief zijn hebben een vergroot risico op het ontwikkelen van EBV-geassocieerde maligniteiten en zouden kunnen profiteren van een EBV-specifiek T-cel product dat een LMP1 of LMP2 antigen herkent in de context van HLA-A*01:01. Vreemd genoeg waren er tot nu toe nog nooit T cellen gevonden die een EBV afkomstig antigen herkennen in de context van HLA-A*01:01. Daarom probeerden we in **hoofdstuk 6** EBV-LMP1 en EBV-LMP2-specifieke T cellen te isoleren uit HLA-A*01:01 positieve donoren ende genetische codes van deze TCRs te achterhalen. HLA-A*01:01-gerestricteerde EBV-LMP2-specifieke T cellen werden succesvol geïsoleerd en hun TCRs werden gekarakteriseerd. Introductie van de sequentie van EBV-LMP2-specifiek TCRs in primaire T cellen resulteerde in een populatie van T cellen die specifiek waren voor EBV-LMP2 en reactiviteit lieten zien tegen HLA-A*01:01 positieve cellijnen die EBV-LMP2 tot expressie brachten. Hierna hebben we deze EBV-LMP2-specifieke TCRs in primaire T cellen geïntroduceerd, waarbij de endogene TCR werd uitgeschakeld (Δ TCR) met behulp van CRISPR-Cas9-technologie om het potentiële misparen van de geïntroduceerde TCR met het endogene TCR te beperken. Na het uitschakelen van de endogene TCR bleken deze T cellen die gemodificeerd waren om EBV-LMP2-specifieke TCRs tot expressie te brengen hun functionaliteit te behouden en lieten ze cytotoxiciteit

zien tegen kwaadaardige cellijnen die EBV-LMP2 tot expressie brachten. Deze HLA-A*01:01-gerestricteerde EBV-LMP2-specifieke TCR zou mogelijk gebruikt kunnen worden in toekomstige TCR-gen-therapie voor de behandeling van patiënten met EBV-geassocieerde latente type II/III maligniteiten die LMP2 tot expressie brengen.

Het onderzoek in dit proefschrift heeft aangetoond dat allo-HLA kruisreactiviteit, gemedieerd door virus-specifieke T-cellen, niet zo onvoorspelbaar is als eerder werd gedacht. Het volgt regels waardoor we een risicobeoordeling kunnen maken van potentiële geschikte derde partij donoren op basis van de HLA achtergrond en HLA restrictie van de T cellen van de derde partij donoren. Bovendien toonde de meerderheid van de virus-specifieke T-cel populaties aan dat ze publieke TCRs tot expressie brachten die kunnen worden gebruikt om virus-specifieke T cellen *in vivo* te volgen, terwijl ze ook goede kandidaten zijn voor toekomstige TCR-gentransfer strategieën, zoals aangetoond door de expansie bij patiënten met CMV/EBV reactivaties.