

Immunogeniciteit van chronische myeloïde leukemie

Auteur E.F.M. Posthuma

Trefwoorden chronische myeloïde leukemie, HLA, interferon- α , donorlymfocyteninfusie.

Samenvatting

Op 9 november 2004 promoveerde drs. E.F.M. Posthuma aan de Universiteit Leiden op het promotieonderzoek getiteld 'Immunogenicity of chronic myeloid leukemia' onder begeleiding van

de promotoren prof. dr. J.H.F. Falkenburg en prof. dr. R. Willemze. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2005;2(2):74-77)

Inleiding

Chronische myeloïde leukemie (CML) is een klonale proliferatie van een hematopoëtische voorlopercel en wordt bij 95% van de patiënten gekenmerkt door de aanwezigheid van het Philadelphia (Ph)-chromosoom. Het Ph-chromosoom ontstaat door een reciproke translocatie tussen het *c-ABL*-gen op chromosoom 9 en het *BCR*-gen op chromosoom 22. Het *BCR-ABL*-fusiegen codeert voor het P210-eiwit. Dit eiwit heeft een verhoogde tyrosinekinaseactiviteit en staat centraal in de pathogenese van CML.

CML kan door de behandeling met allogene stamceltransplantatie (SCT) worden genezen. Klinische observaties laten zien dat het antileukemische effect van SCT niet alleen wordt veroorzaakt door een hoge dosis chemotherapie en een hoge dosis bestraling maar ook door een immuunrespons van donorcellen gericht tegen leukemiecellen, het zogenaamde 'graft-versus-leukemie' (GVL)-effect. Het definitieve bewijs dat donorlymfocyten een GVL-effect kunnen genereren, is de observatie van leukemiecelleneradicatie door donorlymfocyteninfusie (DLI) bij patiënten met een recidief CML na behandeling met allogene SCT. Aangezien deze eradicatie vaak samengaat met 'graft-versus-host disease' (GvHD) is de immuunrespons blijkbaar niet altijd specifiek gericht tegen de leukemie.

Een T-celgemedieerde immuunrespons is afhankelijk van de HLA-moleculen, die zich op de celmembraan bevinden. De functie van HLA is het presenteren van peptiden aan T-lymfocyten zodat een immuunrespons wordt geïnduceerd. Als de T-celre-

ceptor (TCR) wordt geconfronteerd met een lichaamsvreemd peptide in associatie met HLA dan kan er een beschermende immuunrespons worden gegenereerd tegen dit peptide en uiteindelijk wordt de cel die dit peptide bevat gedood.

HLA-moleculen bevatten een groeve waarin peptiden gebonden kunnen worden. In vitro zijn er reactieve T-celresponsen tegen synthetische BCR-ABL-peptiden beschreven in de context van een beperkt aantal HLA-moleculen. Tot op heden is er in vivo echter geen definitief bewijs van een CML-specifieke cytotoxische T-celimmuunrespons.

Achtergrond van het onderzoek

DLI is een zeer effectieve behandeling van een recidief CML maar door niet-leukemiespecifieke alloreactiviteit leidt deze behandeling ook tot GvHD. Het optreden van GvHD is dosisafhankelijk. Een lagere dosis DLI induceert minder GvHD maar resulteert ook in minder remissies van recidief CML. Het eerste doel van het proefschrift was daarom te onderzoeken of DLI voor patiënten met een recidief CML na allogene SCT op een zodanige wijze gemodificeerd kon worden dat de effectiviteit van de behandeling wordt behouden en GvHD wordt verminderd.

De modificatie bestond uit het toevoegen van interferon- α (IFN- α) aan een verlaagde dosis DLI met als doel een snel optredend GVL-effect te induceren. Hierdoor kunnen additionele en hogere DLI-doses

worden voorkomen en kan een toename van GvHD worden vermeden. Een tweede doel van deze modificatie was het verkorten van het interval tussen DLI en de cytogenetische respons waardoor mogelijk ook de eventuele progressie van de ziekte vermindert.

Hoewel de modificatie effectief bleek, was er toch sprake van GvHD. Om een mogelijke leukemie-specifieke immuunrespons te identificeren, werd gekozen voor zowel een indirecte benadering met HLA/CML-associatiestudies als voor een directe benadering door te proberen een BCR-ABL-specifieke cytotoxische T-celrespons te detecteren en/of te genereren.

In eerdere onderzoeken is het opwekken van een T-celimmuunrespons tegen synthetische peptiden, die identiek zijn aan de BCR-ABL-fusieregio, in aanwezigheid van een beperkt aantal HLA-moleculen beschreven. Dit betekent dat als het P210-eiwit wordt gedegeerd in leukemiecellen waardoor delen van dit breukpunteiwit in de HLA-moleculen op de celmembraan worden gepresenteerd, een T-celrespons tegen dit fusie-eiwit zou kunnen ontstaan in aanwezigheid van de juiste HLA-moleculen. Deze reactie en beschrijvingen van de aanwezigheid van (lage) aantallen van *BCR-ABL*-transcripten bij sommige gezonde individuen zijn indicaties voor een mogelijke BCR-ABL-specifieke immunologische surveillance.

Het tweede doel van dit proefschrift was daarom te onderzoeken of er verschillen zijn in HLA-frequenties tussen CML-patiënten en gezonde individuen. De rationale was dat als in vivo degradatie van P210 in het cytoplasma leidt tot presentatie van BCR-ABL-specifieke peptiden in HLA, er mogelijk een immuunrespons kon worden gegenereerd tegen deze peptiden. Hierdoor worden individuen met de relevante HLA-moleculen beschermd tegen CML-ontwikkeling. Verwacht werd dat bij CML-patiënten lagere frequenties van deze protectieve HLA-typen zouden worden gevonden dan bij gezonde individuen. Een dergelijke negatieve associatie werd inderdaad gevonden voor een aantal HLA-typen. Dit resulteerde in het derde doel van dit proefschrift, namelijk het identificeren van een CML-specifieke immuunrespons in de context van HLA-A3 of HLA-B8.

Resultaten

In dit proefschrift is aangetoond dat de toevoeging van IFN- α aan een verlaagde dosis DLI voor patiënten met cytogenetische of hematologische recidieven een effectieve strategie is.¹ Meer dan 90% van de

patiënten bereikte een complete cytogenetische respons (CCR), in alle gevallen gevolgd door een compleet donorchimerisme en bij 11 van de 12 patiënten door een moleculaire remissie.

In vergelijking met eerdere onderzoeken waarbij ook een lage celdosis werd gebruikt, was het mediane tijdsinterval tussen DLI en CCR van 7 weken (spreiding 5-18) relatief kort en was de GvHD acceptabel. Een korte interval tussen allogene SCT en recidief (<12 maanden) was geassocieerd met GvHD. Daarentegen werd er geen relevante GvHD gezien bij patiënten met een recidief langer dan 12 maanden na SCT. De totale overleving was 100% na 1 jaar, 85% na 3 jaren en 76% na 5 jaren.

Voor patiënten met een moleculair recidief was behandeling met een verlaagde dosis DLI zonder IFN- α zeer effectief en was er sprake van een lage GvHD-incidentie. Na een mediane follow-up van 20 maanden is 100% van deze patiënten in leven. Omdat GvHD toch aanwezig was bij enkele patiënten was de DLI kennelijk niet leukemiespecifiek bij deze patiënten. Daarentegen wijzen de remissies bij andere patiënten zonder het optreden van GvHD op een mogelijk GVL-effect veroorzaakt door een leukemiespecifieke immuunrespons of een respons tegen hematopoësegerestricteerde minor histocompatibiliteitsantigenen (mHags).

Vervolgens werden in associatiestudies de HLA-frequenties tussen CML-patiënten en gezonde individuen vergeleken. Het onderzoek werd beperkt tot die HLA-moleculen, waarbij er in vitro BCR-ABL-reactieve T-celresponsen waren beschreven. Een negatieve associatie tussen een bepaald HLA-type en CML zou kunnen wijzen op een autologe immuunrespons die de ontwikkeling naar CML verhindert.

De frequenties van HLA-A3, HLA-A11 en HLA-B8 bij CML-patiënten werden met de frequenties bij gezonde individuen vergeleken in een 'multicenter case control study' en in een meta-analyse van 5 eerder gepubliceerde associatiestudies.² De case control-studie omvatte 1.899 patiënten uit het register van de 'European Blood and Marrow Transplantation' (EBMT)-organisatie en 512.363 gezonde controlepersonen uit het register van 'Bone Marrow Donors Worldwide'. Dit resulteerde in een OR van 0,90 (95% betrouwbaarheidsinterval (BI) 0,80-1,00) voor HLA-A3, een OR van 1,16 (95% BI 1,02-1,33) voor HLA-A11, en een OR van 0,73 (95% BI 0,65-0,82) voor HLA-B8. Co-expressie van HLA-A3 en HLA-B8 gaf een OR van 0,51 (95% BI 0,40-0,67). Dit zou vertaald kunnen worden in een beschermend

effect van 27% voor HLA-B8, 10% voor HLA-A3 en 49% protectie voor de combinatie van HLA-A3 en HLA-B8. De negatieve associatie tussen HLA-B8 en CML werd bevestigd door een meta-analyse van eerdere studies, die 463 CML-patiënten en 4.912 controles omvatten. De resultaten van deze analyse was een OR van 0,71 (95% BI 0,52-0,97) voor HLA-B8. Voor HLA-A3 en HLA-A11 werden er geen significante verschillen gevonden in de meta-analyse.

Concluderend wijzen deze resultaten op een negatieve associatie tussen CML en HLA-B8 en HLA-A3. Dit zou compatibel kunnen zijn met een biologisch mechanisme waarbij presentatie van BCR-ABL-breukpuntpeptiden in deze HLA-moleculen mogelijk leidt tot een beschermende immuunrespons.

In een tweede analyse werden vergelijkingen gemaakt tussen de frequenties van de HLA-klasse-II-moleculen HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4 en HLA-DR11 bij 1.462 CML-patiënten uit de database van de EBMT en bij 500.596 gezonde controlepersonen uit het register van 'Bone Marrow Donors Worldwide'.³ Dit resulteerde in een significant lagere OR van 0,86 (95% BI 0,75-0,98) voor HLA-DR3 en 0,80 (95% BI 0,71-0,89) voor HLA-DR4. Er werden geen significante verschillen gevonden voor de andere onderzochte HLA-moleculen.

Het beschermende effect van HLA-DR3 wordt veroorzaakt door het 'linkage disequilibrium' met HLA-B8 zoals blijkt uit een OR van 0,84 (95% BI 0,72-0,98) voor co-expressie van HLA-B8 en HLA-DR3 en een OR van 1,02 (95% BI 0,84-1,24) voor HLA-DR3-positieve/HLA-B8-negatieve individuen. Ondanks dat er geen 'linkage disequilibrium' van HLA-DR4 met HLA-A3 of HLA-B8 is, is de expressie van HLA-DR4 wel geassocieerd met een verminderde CML-incidentie. Deze incidentie wordt mogelijk veroorzaakt door de presentatie van BCR-ABL-breukpuntpeptiden in HLA-DR4 op de membraan van de leukemiecellen.

Homozygotie voor HLA-DR4 resulteerde in een sterkere negatieve associatie met CML dan heterozygotie (OR 0,18; 95% BI 0,12-0,27), hetgeen een causale rol van HLA-DR4 meer waarschijnlijk maakt.

Bovenstaande resultaten zijn compatibel met een CML-specifieke immuunrespons maar leveren hiervoor niet het bewijs. Daarom werd eerst de binding van de BCR-ABL-afgeleide peptiden KQSSKALQR en GFKQSSKAL aan respectievelijk HLA-A3 en HLA-B8 geanalyseerd.⁴ 'Peptide binding assays'

bevestigden de sterke binding van het CML-specifieke peptide KQSSKALQR aan HLA-A3-moleculen en de veel zwakkere binding van GFKQSSKAL aan HLA-B8-moleculen.

Vervolgens werd onderzocht of het CML-specifieke P210-eiwit door het proteasoom verwerkt kan worden tot peptiden met een geschikt bindingsmotief voor HLA-A3- of HLA-B8-moleculen. Splitsingsplaatsen ('cleavage sites') werden gevonden aan weerszijden van het KQSSKALQR-breukpuntpeptide dat kan binden aan HLA-A3. Er werden geen splitsingsplaatsen gevonden voor het HLA-B8-bindende GFKQSSKAL-peptide. Pogingen om cytotoxische T-celklonen specifiek voor BCR/ABL-specifieke peptiden te isoleren werden daarom beperkt tot het HLA-A3-gerelateerde KQSSKALQR-peptide. Dit werd getracht bij zowel gezonde HLA-A3-positieve individuen als bij HLA-A3-positieve patiënten met een recidief CML na allogene SCT en die met succes waren behandeld met behulp van DLI. Eerst werd geprobeerd BCR-ABL-reactieve T-cellijnen te genereren waarbij dendritische cellen, die afkomstig waren van gezonde HLA-A3-positieve individuen en beladen zijn met het KQSSKALQR-peptide gebruikt werden als stimulatorcellen en waarbij autologe T-cellen gebruikt werden als respondercellen. T-cellen werden gevisualiseerd door kleuring met HLA-A3/KQSSKALQR-PE-tetrameren.

Hoewel er cellijnen met kleine fracties van tetrameerpositieve T-cellen werden gegenereerd, kon KQSSKALQR-specifieke cytotoxische reactiviteit niet worden aangetoond. De T-cellijnen werden vervolgens gesorteerd (een cel/well) om te verrijken voor tetrameerpositiviteit en hiermee de mogelijke cytotoxiciteit te vergroten. Meerdere tetrameerpositieve klonen werden geïsoleerd en konden worden geëxpandeerd, maar er werd geen KQSSKALQR-specifieke cytotoxiciteit aangetoond. Daarom werd getracht KQSSKALQR-specifieke T-celklonen uit perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC) te isoleren van patiënten met een recidief CML na allogene SCT die succesvol waren behandeld met DLI. Deze aanpak is recent succesvol gebleken bij het isoleren van HA-1- en HA-2-specifieke T-celklonen bij dezelfde categorie patiënten.

Hoewel er opnieuw HLA-A3/KQSSKALQR-tetrameerpositieve cellen werden gevonden, bleek het vervolgens niet mogelijk om specifieke cytotoxische T-celklonen te isoleren. Daarom werd onderzocht of tetrameerpositiviteit een specifieke binding aan de T-celreceptor impliceert. Analyse van tetrameerpositieve T-cellen liet een non-specifieke peptidebinding

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Bij een cytogenetisch of hematologisch CML-recidief na allogene T-celgedepleteerde SCT kan door toevoeging van IFN- α een lagere dosis DLI gegeven worden.
2. Een moleculair recidief kan succesvol met een lage dosis DLI zonder toevoeging van IFN- α behandeld worden.

van tetrameren aan T-cellen zien en dit resultaat is een mogelijke verklaring voor het niet kunnen isoleren van de KQSSKALQR-specifieke T-celklonen.

Conclusie

In dit promotieonderzoek werd de effectiviteit aangetoond van de toevoeging IFN- α aan een verlaagde dosis DLI als behandeling voor een recidief CML na een allogene SCT. Verder werd geobserveerd dat een interval van meer dan 12 maanden tussen een SCT en recidief gecorreleerd is met een vrijwel volledige afwezigheid van GvHD na een DLI. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat na de transplantatie de dendritische cellen van de ontvanger maar langzaam worden vervangen door de dendritische cellen van de donor. Mogelijk kan verlenging van dit interval leiden tot minder GvHD na DLI. Een aantrekkelijke manier om dit te bewerkstelligen zou behandeling met de BCR-ABL-specifieke tyrosinekinaseremmer imatinib methylaat kunnen zijn.

Hoewel er in dit promotieonderzoek indirecte aanwijzingen werden gevonden voor een mogelijke CML-specifieke immuunrespons kon het directe bewijs voor het bestaan hiervan niet geleverd worden. Door de verdere identificatie van CML-geassocieerde antigenen of mHag's die preferentieel op leukemiecellen tot expressie komen, komen er meer antigenen beschikbaar om gebruikt te worden voor het induceren van leukemiereactieve T-celgedepleteerde immuunresponsen.

Referenties

1. Posthuma EF, Marijt WA, Barge RM, Van Soest RA, Baas IO, Starrenburg CW, et al. α -Interferon with very-low-dose donor lymphocyte infusion for hematologic or cytogenetic relapse of

chronic myeloid leukemia induces rapid and durable complete remissions and is associated with acceptable graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transpl 2004;10:204-12.

2. Posthuma EF, Falkenburg JH, Apperley JF, Gratwohl A, Roosnek E, Hertenstein B, et al. HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3863-5.

3. Posthuma EF, Falkenburg JH, Apperley JF. HLA-DR4 is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2000;14:859-62.

4. Posthuma EF, Van Bergen CA, Kester MG, De Paus RA, Van Veelen PA, De Ru AH, et al. Proteasomal degradation of BCR/ABL protein can generate a CML-specific HLA-A*0301 restricted peptide, but high-avidity T-cells recognizing this BCR/ABL-specific antigen could not be demonstrated. *Haematologica* 2004;89:1062-71.

Ontvangen 25 januari 2004, geaccepteerd 15 februari 2005.

Correspondentieadres

Dr. E.F.M. Posthuma, internist-hematoloog

Reinier de Graaf groep
Afdeling Hemato-oncologie
Postbus 5011
2600 GA Delft
Tel.: 015 260 31 09
E-mail: posthuma@rdgg.nl

Belangenconflict : geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.