

T-cellen als behandeling voor adenovirusinfectie na stamceltransplantatie

M.L. Zandvliet ^{a*}, J.H.F. Falkenburg ^b, E. van Liempt ^b, L.A. Veltrop-Duits ^c, A.C. Lankester ^c, J.S. Kalpoe ^d, M.G.D. Kester ^b, D.M. van der Steen ^b, M.J. van Tol ^c, R. Willemze ^b, H-J. Guchelaar ^a, M.W. Schilham ^c en P. Meij ^a

^a Afdeling Klinische Farmacie en Toxicologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^b Afdeling Hematologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^c Afdeling Kinder- en Jeugdcentrum, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

^d Afdeling Medische Microbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

* Huidig adres: Apotheek, Erasmus MC, Rotterdam. Correspondentie: m.zandvliet@erasmusmc.nl.

KERNPUNTEN

- Na allogene stamceltransplantatie kunnen adenovirusinfecties leiden tot ernstige complicaties en mortaliteit.
- Een gecombineerde respons van CD8-positieve en CD4-positieve T-cellen tegen adenovirus-hexonepitopen is geassocieerd met klaring van adenovirus.
- Adenovirus-hexonspecifieke T-cellen geïsoleerd uit perifere bloed van de stamcel donor kunnen gebruikt worden voor preventie of behandeling van adenovirusziekte na stamceltransplantatie.

Inleiding

Humaan adenovirus kan ernstige complicaties veroorzaken bij immuungecompromitteerde patiënten, vooral bij kinderen na allogene stamceltransplantatie [1-3]. Onvoldoende afweer door T-cellen kan leiden tot gedissemineerde adenovirusziekte, die is geassocieerd met hoge mortaliteit. Er zijn geen gecontroleerde studies met antivirale geneesmiddelen zoals ribavirine en cidofovir die hun werkzaamheid tegen adenovirusziekte aantonen, en hun toepassing wordt beperkt door toxiciteit. Herstel van immuniteit, in de vorm van T-cellen die specifiek zijn voor adenovirus, is essentieel ter bescherming tegen adenovirusziekte na stamceltransplantatie [4-6]. Bevordering van herstel van adenovirus-specifieke T-cellen door deze cellen van de stamcel donor naar de patiënt over te brengen, zou een effectieve en langdurige bescherming tegen adenovirus kunnen bieden.

T-cellen die adenovirus-epitopen herkennen, zijn bij gezonde volwassenen in kleine aantallen aangetoond. Het zijn vooral CD4-positieve T-helpercellen, hoewel ook CD8-positieve cytotoxische T-cellen werden gezien. De T-cellen herkennen vooral structurele eiwitten van het virus, zoals het adenovirus-hexoneiwit [7]. De epitopen die door de T-cellen herkend werden, zijn geconserveerd aanwezig in verschillende adenovirusvarianten,

ABSTRACT

Combined CD8-positive and CD4-positive adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection

OBJECTIVE

To investigate the role of both CD8-positive cytotoxic and CD4-positive helper T cells against the adenovirus hexon protein in protection from adenovirus disease, and to develop a method to allow transfer of these T cells as a treatment option. Human adenovirus can cause morbidity and mortality in immunocompromised patients after allogeneic stem cell transplantation. Reconstitution of adenovirus-specific CD4-positive helper T cells has been reported to be associated with sustained protection from adenovirus disease, but epitope specificity of these responses has not been characterized.

DESIGN AND METHODS

The presence of T cells specific for adenovirus hexon was analyzed in peripheral blood of paediatric and adult allogeneic stem cell transplantation recipients who showed spontaneous resolution of disseminated adenovirus infection. Isolation of the specific T cells from healthy donors was performed by magnetic separation after antibody labelling.

RESULTS

Clearance of adenovirus viremia coincided with emergence of a coordinated CD8-positive and CD4-positive T cell response against adenovirus hexon epitopes in patients after allogeneic stem cell transplantation. Specific T cells were efficiently isolated from donor peripheral blood, resulting in adenovirus-specific T cell lines, which were functional and efficiently lysed adenovirus-infected target cells.

CONCLUSION

This study provides a rationale and strategy for the transfer of donor-derived adenovirus-specific CD8-positive and CD4-positive T cells for the treatment of disseminated adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation.

Zandvliet ML, Falkenburg JHF, van Liempt E, Veltrop-Duits LA, Lankester AC, Kalpoe JS, Kester MGD, van der Steen DM, van Tol MJ, Willemze R, Guchelaar HJ, Schilham MW, Meij P. T-cellen als behandeling voor adenovirusinfectie na stamceltransplantatie. PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:a1208.

Dit artikel is een bewerkte vertaling van: Zandvliet ML, Falkenburg JHF, van Liempt E, Veltrop-Duits LA, Lankester AC, Kalpoe JS, Kester MGD, van der Steen DM, van Tol MJ, Willemze R, Guchelaar HJ, Schilham MW, Meij P. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. Haematologica. 2010;95:1943-51.

Cytotoxische capaciteit werd getest met een ^{51}Cr release assay [9]. Hiertoe werden fibroblasten geïncubeerd met 10^{-6} mol/L adenoviruspeptiden of deeltjes adenovirus serotype 5 (*multiplicity of infection* 500). Na wassen werden de fibroblasten gedurende een uur gelabeld met $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ en geïncubeerd met een T-cel lijn. Na tien uur werd supernatant geoogst om de hoeveelheid ^{51}Cr te bepalen als maat voor specifieke celdood. Verdere details betreffende de methoden zijn beschreven in de oorspronkelijke publicatie [10].

Resultaten

Om bij gezonde volwassen donoren de T-celrespons te analyseren die gericht was tegen adenovirus-hexoneiwit, als mogelijke bron voor T-celtherapie, werd de frequentie van hexonspecifieke CD8-positieve cytotoxische en CD4-positieve T-helpercellen bepaald. Hiertoe werden mononucleaire cellen uit perifere bloed geïncubeerd met een pool van synthetische peptiden die het volledige adenovirus-hexoneiwit omvat. Specifieke T-cellen werden hierdoor geactiveerd en gingen IFN γ produceren, wat door flowcytometrie met een fluorescent label gemeten kon worden op celniveau. Daarnaast brachten geactiveerde CD4-positieve T-cellen het molecuul CD40L tot expressie, wat gebruikt is als tweede parameter voor activatie.

Na stimulatie met de hexonpeptiden werden bij 6 van 16 gezonde donoren CD8-positieve T-cellen en bij 13 van 16 donoren CD4-positieve T-cellen tegen adenovirus-hexon gemeten, met frequenties van 0,03-0,46% van de T-cellen. Van de overige donoren werd perifeer bloed een week gekweekt met gepooled hexonpeptide, waardoor de specifieke T-cellen gingen prolifereren, waarna bij alle donoren hexon-specifieke CD8-positieve en CD4-positieve T-cellen gemeten konden worden. Deze resultaten geven aan dat bij alle gezonde donoren kleine tot zeer kleine aantallen T-cellen gericht tegen adenovirus-hexonepitopen aanwezig zijn.

Om de therapie met specifieke T-cellen tegen adenovirus-hexon te onderbouwen, is vervolgens onderzocht of de ontwikkeling van hexonspecifieke T-cellen bij patiënten na allogene stamceltransplantatie is geassocieerd met klaring van adenovirus. Uit eerder beschreven cohorten zijn 7 kinderen en 6 volwassenen geselecteerd die adenovirusziekte ontwikkelden na allogene stamceltransplantatie, bij wie adenovirus-DNA in plasma aanwezig was en die vervolgens spontaan herstelden van gedissemineerde adenovirusziekte [3, 4]. T-celresponsen tegen adenovirus-hexon konden niet geanalyseerd worden bij patiënten die overleden aan adenovirusziekte, omdat slechts enkele bloedmonsters beschikbaar waren met daarin erg kleine aantallen T-cellen. Monsters perifeer bloed die waren verkregen tijdens adenovirusziekte, waren beschikbaar van 10 patiënten, en bloedmonsters verkregen na klaring van adenovirus waren beschikbaar van alle 13 patiënten.

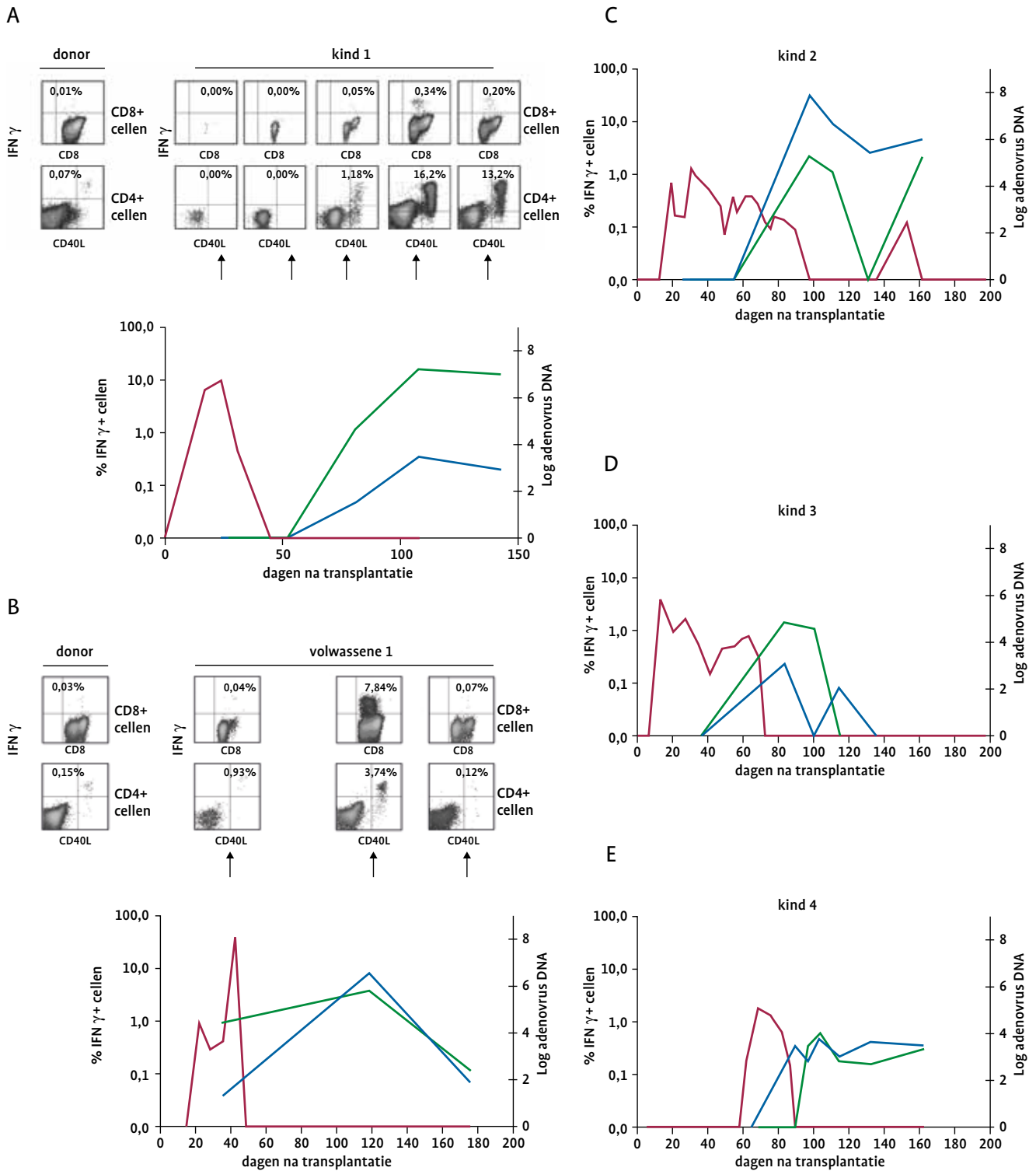
Tijdens adenovirusziekte konden direct ex vivo geen hexonspecifieke CD8-positieve T-cellen gevonden worden, en hexonspecifieke CD4-positieve T-cellen werden gedetecteerd bij slechts 2 patiënten (figuur 1A). Na een week kweken van de monsters met gepooled hexonpeptide konden kleine aantallen hexonspecifieke CD4-positieve T-cellen worden aangetoond bij 5 patiënten, terwijl geen hexonspecifieke CD8-positieve T-cellen werden gevonden. Na klaring van adenovirusziekte werden hexonspecifieke CD8-positieve

T-cellen gemeten bij 7 patiënten, en hexonspecifieke CD4-positieve T-cellen bij alle patiënten (figuur 1B). Na een week specifieke expansie werden zowel CD8-positieve als CD4-positieve T-cellen gericht tegen adenovirus-hexon aangetoond bij 12 van de 13 patiënten.

Figuur 2 geeft een meer gedetailleerde analyse van de ontwikkeling van de adenovirus-specifieke T-celrespons bij 5 patiënten van wie meerdere bloedmonsters beschikbaar waren. Bij deze patiënten werden tijdens adenovirusziekte geen of nauwelijks T-cellen tegen hexonepitopen gevonden. Na klaring van adenovirus steeg het aandeel hexonspecifieke T-cellen sterk: tot 30% van de CD8-positieve T-cellen en tot 16% van de CD4-positieve T-cellen in perifere bloed. De hexonspecifieke T-cellen kwamen op direct na klaring van adenovirus-DNA uit plasma. De relatie tussen ontwikkeling van hexonspecifieke T-cellen en beheersing van adenovirusinfectie werd nog geïllustreerd door de kleine virale reactivatie op dag 152 na transplantatie bij patiënt 2, die werd gevolgd door een toename van specifieke T-cellen en tegelijkertijd virale klaring (figuur 2C). Deze resultaten laten zien dat een gecombineerde CD8-positieve en CD4-positieve T-celrespons tegen adenovirus-hexonepitopen geassocieerd is met klaring van adenovirusziekte bij zowel kinderen als volwassenen na allogene stamceltransplantatie.

Om na allogene stamceltransplantatie bij patiënten met adenovirusziekte een veilige behandeling mogelijk te maken met gecombineerde CD8-positieve en CD4-positieve T-cellen tegen adenovirus-hexon, werd een methode ontwikkeld om deze T-cellen te isoleren uit perifere bloed van gezonde donoren. Hiertoe werden mononucleaire cellen uit perifere bloed gestimuleerd met de pool van synthetische overlappende hexonpeptiden, en vervolgens werden IFN γ -producerende cellen geïsoleerd en gekweekt in aanwezigheid van de groeifactor interleukine 2. De gegevens van een representatieve T-cel lijn zijn afgebeeld in figuur 3A-C. Voor isolatie werden zeer kleine aantallen van 0,01-0,02% adenovirus-specifieke T-cellen gemeten (figuur 3A). Na isolatie en veertien dagen kweken bestond de cellijn vrijwel uitsluitend uit T-cellen, waarbij 94% van de CD8-positieve T-cellen en 91% van de CD4-positieve T-cellen gericht waren tegen adenovirus-hexonepitopen (figuur 3B). Een nadere analyse toonde aan dat een groot gedeelte van de CD8-positieve T-cellen (58% van alle cellen) was gericht tegen een eerder beschreven specifiek hexonepitoot: hexon-MPN-B35. In de overgebleven celfractie werden na kweken slechts kleine aantallen adenovirus-specifieke T-cellen waargenomen (figuur 3C). Om te controleren of de T-cellijnen daadwerkelijk adenovirusgeïnficeerde cellen konden herkennen en vernietigen, werden fibroblasten gebruikt die makkelijk door adenovirus geïnficeerd kunnen worden. De adenovirus-specifieke T-cellijnen vernietigden zeer efficiënt fibroblasten die beladen waren met adenoviruspeptiden of die geïnficeerd waren met adenovirus, terwijl ze geen effect hadden op adenovirusgeïnficeerde fibroblasten met andere *human leukocyte antigen*-moleculen als controle voor specifieke herkenning. De T-cellen hadden markers op het oppervlak die karakteristiek waren voor T-geheugencellen, gingen sterk prolifereren na activatie en waren volledig functioneel door middel van cytokineproductie en cytotoxische capaciteit, zoals past bij een adequate fysiologische T-celrespons.

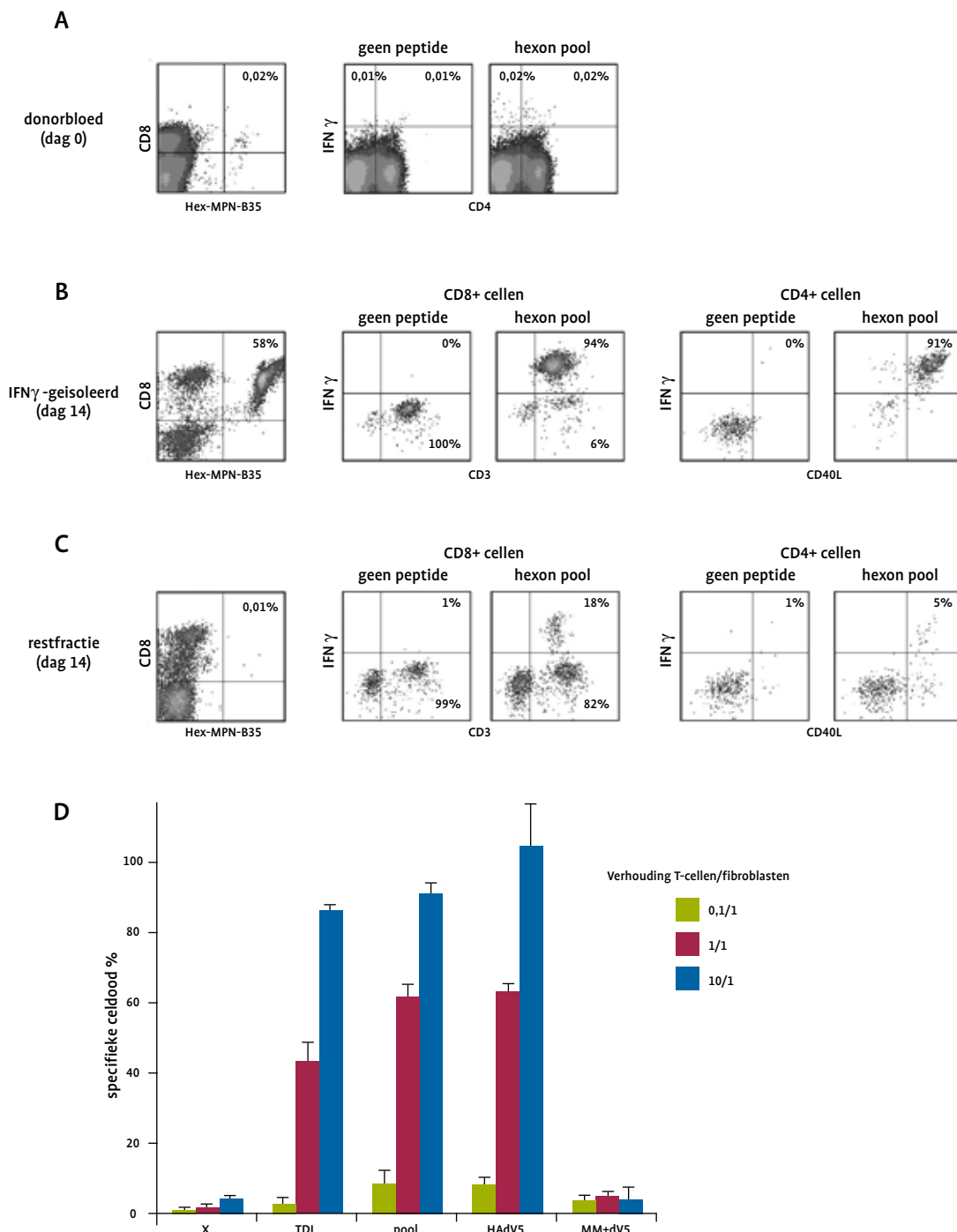
FIGUUR 2
GEDETAILEERDE ANALYSE VAN ADENOVIRUSSPECIFIEKE T-CELRESPONS BIJ PATIËNTEN NA ALLOGENE STAMCELTRANSPLANTATIE



De dot plots tonen geactiveerde IFN γ - en CD40L-positieve T-cellen na stimulatie met gepoolde adenovirus-hexonpeptide van monsters perifeer bloed van (A) kind 1 en (B) volwassene 1, verkregen tijdens en na klaring van adenovirusziekte. De grafieken tonen aandelen van specifieke IFN γ -producerende cellen onder CD8-positieve T-cellen (blauwe lijn) en onder CD4-positieve T-cellen (groene lijn), en de plasma load van adenovirus-DNA (rode lijn). Deze grafieken zijn ook getoond in (C), (D), en (E), voor kinderen 2, 3 en 4.

FIGUUR 3

Voorbeeld van een adenovirusspecifieke T-cel lijn met CD8-positieve en CD4-positieve T-cellen gericht tegen adenovirus-hexonepitopen



(A) Kleuring [met peptide-MHC-tetrameer (MHC = major histocompatibility complex)] van CD8-positieve T-cellen die specifiek zijn voor het hexonepitop MPN-B35, en van specifieke IFN γ -producerende T-cellen na stimulatie met gepooled adenovirus-hexonpeptide van perifeer bloed van gezonde donor 1. Specificiteit van (B) de IFN γ -geïsoleerde cel lijn en (C) de achtergebleven fractie na veertien dagen kweken, bepaald door kleuring met hetzelfde peptide-MHC-tetrameer, en IFN γ -productie na stimulatie met controlecellen of met cellen beladen met gepooled adenovirus-hexonpeptide. (D) Specifieke celdood van HLA-gematchte of -gemismatchte (MM) fibroblasten beladen met controlemedium (X), specifiek hexonpeptide (TDL), gepooled hexonpeptide (pool), of geïnfecteerd met adenovirus type 5 (HAdV5), na tien uur incubatie met de T-cel lijn afkomstig van gezonde donor 4, bij drie verhoudingen van T-cellen en fibroblasten.

Ten slotte werd geanalyseerd welke bekende adenovirus-hexonepitopen door de T-cellijnen herkend werden, en werden enkele nieuwe epitopen geïdentificeerd. Hieruit bleek dat de T-cellijnen meerdere CD8-positieve en CD4-positieve adenovirus-hexonepitopen herkenden, die geconserveerd waren in verschillende adenovirusvarianten.

Beschouwing

Op grond van onze waarneming dat herstel van adenovirusziekte gepaard ging met de ontwikkeling van een gecombineerde CD8-positieve en CD4-positieve T-celrespons tegen adenovirus-hexonepitopen, hebben we een methode ontwikkeld om T-cellijnen te produceren die specifiek zijn voor het hexon, als behandeling voor patiënten met adenovirusziekte na allogene stamceltransplantatie. Omdat in eerdere studies vooral CD4-positieve T-cellen tegen adenovirus zijn gevonden, en deze CD4-positieve T-helpercellen ook cytotoxische capaciteit bezitten, is getwijfeld aan de rol van CD8-positieve T-cellen bij bescherming tegen adenovirus. In dit onderzoek hebben we met zeer gevoelige technieken gekeken naar T-cellen met specificiteit voor adenovirus-hexon, waarbij we bij gezonde volwassenen en bij patiënten na allogene stamceltransplantatie zowel CD8-positieve als CD4-positieve T-cellen tegen hexonepitopen hebben gevonden. Dit is de eerste keer dat een associatie is aangetoond tussen de ontwikkeling van adenovirus-specifieke CD8-positieve T-cellen en klaring van adenovirusziekte na transplantatie. De gegevens suggereren dat gecombineerde responsen van CD8-positieve en CD4-positieve T-cellen zorgen voor verweer tegen adenovirusinfecties, en dat deze cellen vervolgens als T-geheugencellen in kleine aantallen blijven circuleren, zoals ook beschreven is voor de meeste andere virale infecties.

Ondanks de kleine tot zeer kleine aantallen specifieke T-cellen tegen adenovirus-hexon, konden door middel van peptidestimulatie gevolgd door IFN γ -isolatie T-cellijnen gegenereerd worden met zeer grote aantallen adenovirus-specifieke T-cellen. In tegenstelling tot eerdere studies hebben we een hoge en gedefinieerde specificiteit voor adenovirus-epitopen kunnen aantonen. Het risico op *graft-versus-host disease* zal bepaald worden door het repertoire aan T-cellen met een onbekende specificiteit, ofwel door het absolute aantal T-cellen dat niet specifiek is voor adenovirus dat in de geïsoleerde T-cel lijn terechtkomt. De zeer kleine aantallen T-cellen met onbekende specificiteit zullen leiden tot een heel gering risico op *graft-versus-host disease*. Tot nu toe zijn in klinische studies met T-cellen die waren geïsoleerd op basis van IFN γ -productie, nog geen bijwerkingen waargenomen die gerelateerd werden aan de behandeling.

De aanwezigheid van zowel CD8-positieve als CD4-positieve T-cellen gericht tegen adenovirus-hexonepitopen bij gezonde volwassenen en na klaring van adenovirusinfecties bij patiënten na stamceltransplantatie, suggereert dat gecombineerde T-celresponsen tegen hexoneiwit nodig zijn voor bescherming tegen adenovirusziekte. Dit onderzoek levert daarnaast een strategie om deze T-cellen te selecteren uit perifeer bloed van de stamcel donor en ze over te brengen naar patiënten ter preventie of behandeling van adenovirusziekte. Deze strategie en soortgelijke behandelwij-

zen zullen in de nabije toekomst toegepast worden in klinische studies in een samenwerking tussen de afdelingen Klinische Farmacie en Toxicologie, Hematologie, en het Kinder- en Jeugdcentrum van het Leids Universitair Medisch Centrum.

LITERATUUR

- 1 Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):331-9.
- 2 Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(2):79-86.
- 3 Kalpoe JS, van der Heiden PL, Barge RM, et al. Assessment of disseminated adenovirus infections using quantitative plasma PCR in adult allogeneic stem cell transplant recipients receiving reduced intensity or myeloablative conditioning. *Eur J Haematol*. 2007;78(4):314-21.
- 4 Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis*. 2005;191(4):520-30.
- 5 Myers GD, Bollard CM, Wu MF, et al. Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(11):677-86.
- 6 Feuchtinger T, Lücke J, Hamprecht K, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2005;128(4):503-9.
- 7 Onion D, Crompton LJ, Milligan DW, et al. The CD4+ T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 9):2417-25.
- 8 Claas EC, Schilham MW, de Brouwer CS, et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1738-44.
- 9 Faber LM, van Luxemburg-Heijs SA, Willemze R, Falkenburg JH. Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte clones from the HLA-identical bone marrow donor of a patient with leukemia. *J Exp Med*. 1992;176(5):1283-9.
- 10 Zandvliet ML, Falkenburg JH, van Liempt E, et al. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica*. 2010;95(11):1943-51.