

University of Groningen

Targeted induction of apoptosis for cancer therapy

Bremer, Edwin

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bremer, E. (2006). *Targeted induction of apoptosis for cancer therapy*. [s.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Chapter 9

In het lichaam van een gezond en volwassen individu is het aantal lichaamscellen gemiddeld gesproken constant. Het is van essentieel belang voor het volgroeide lichaam dat er een nauwkeurige balans bestaat tussen de afbraak van oude, beschadigde, of "zieke" cellen en de aanmaak van nieuwe gezonde cellen. Grondslag voor deze balans is een cellulair proces dat apoptose genoemd wordt. Apoptose is een vorm van geprogrammeerde celdood waarbij lichaamscellen zelf en/of onderling zorgen voor een correcte en tijdige vernietiging. Tijdige vernietiging van lichaamscellen, c.q. beperking van hun levensduur, is belangrijk omdat iedere delende cel na verloop van tijd mutaties oploopt in het genetische materiaal, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot ongewenst en gevaarlijk cellulair gedrag. Ook in het embryonale stadium is apoptose belangrijk en wel voor het verwijderen van ongewenste cellen en overbodig geworden weefselstructuren.

Apoptose is een nauwkeurig gecontroleerd cellulair proces dat biochemisch gesproken energie kost. Dit in tegenstelling tot ongecontroleerde celdood, ook wel necrose genoemd, waarbij de cel opzwellt en daarna openbarst (cytolyse). Necrose is vaak schadelijk voor het organisme aangezien de hierbij vrijkomen celinhoud omliggende cellen kan aantasten. Bovendien trekt de vrijgekomen celinhoud opruimende cellen van het afweersysteem aan, waarbij een ontstekingsproces op gang komt dat de omliggende weefsels kan beschadigen.

Bij apoptose krimpt een cel, wordt de kern van de cel gefragmenteerd, en valt de cel ten slotte uit elkaar in vele kleine delen (zogenoemde apoptotic bodies) zonder dat daarbij de celinhoud vrijkomt. De apoptotische cel en/of de apoptotic bodies worden snel en zonder verdere schade door cellen van het afweersysteem opgeruimd. Om de correcte activatie en executie van apoptose te garanderen beschikt het lichaam over een uitgebreid pro- en anti-apoptotisch regulatiesysteem, waarbij vele verschillende receptoren en signaalverwerkende moleculen nauwkeurig samenwerken.

Onderzoek naar apoptose heeft de laatste decennia een enorme vlucht genomen, wat heeft geleid tot het ophelderen van belangrijke achtergronden van uiteenlopende ziekten. Te veel, te weinig, te late, of afwezigheid van apoptose leidt onherroepelijk tot ziekte. Tussen degeneratieve ziekten van de hersenen, chronische ontstekingen, en kanker lijken op het eerste gezicht weinig overeenkomsten te bestaan, maar elk van deze ziekten wordt gekarakteriseerd door een verstoord apoptotisch proces.

Bij kanker is in het algemeen sprake van een verminderde gevoeligheid voor apoptose. Dit begint reeds bij het ontstaan van kanker. Bepaalde defecten in apoptose kunnen bijvoorbeeld leiden tot een gevaarlijk verlengde levensduur van de cellen, die uiteindelijk resulteert in cellulaire onsterfelijkheid met als gevolg tumorvorming. Aanvankelijk zijn deze tumoren nog goedaardig, maar doordat de tumor op den duur steeds meer

mutaties oploopt, ontstaat na verloop van tijd kwaadaardig cellulair gedrag. Sommige defecten maken kankercellen minder gevoelig voor pro-apoptotische signalen vanuit de extracellulaire omgeving, zoals bijv. afkomstig van buurcellen of cellen van het afweersysteem. Daarnaast kunnen defecten zorgen voor een sterk verhoogde activatie van anti-apoptotische systemen. Tezamen leidt dit er uiteindelijk toe dat kankercellen veel sneller kunnen groeien dan hun normale tegenhangers. Deze versnelde celgroei vergt uiteraard een verhoogd metabolisme in de kankercel en gaat gepaard met het ontstaan van intracellulaire stress. Dergelijke stress maakt cellen, ook kankercellen, gevoeliger voor apoptose. Deze toegenomen gevoeligheid wordt in kankercellen gecompenseerd door een verhoogde activiteit van de anti-apoptotische systemen. In feite staan kankercellen dus klaar om in apoptose te gaan, wat alleen voorkomen wordt door de verhoogde activiteit van anti-apoptotische systemen. Conventionele kankerbehandeling met chemotherapie en bestraling brengt zoveel schade aan in snel groeiende kankercellen dat deze alsnog tot apoptose worden gedwongen. Dit leidt echter ook tot ongewenste schade aan gezonde cellen met alle bekende nadelige gevolgen van dien. De balans in kankercellen tussen pro- en anti-apoptotische systemen selectief beïnvloeden is dan ook de belangrijkste uitdaging voor nieuwe kankertherapieën.

Reeds vele jaren is er onderzoek gedaan naar nieuwe therapieën die specifiekere kankercellen kunnen opsporen om ze vervolgens te vernietigen met zo weinig mogelijk schade aan normale cellen. Gezamenlijk worden deze therapieën aangeduid met de Engelse term Targeted Therapy. In zijn algemeenheid wordt hierbij geprobeerd een groeiremmende of hoog toxische stof selectief af te leveren (of werkzaam te laten zijn) op de plek van de tumor. Hierbij wordt vaak gebruik gemaakt van kankerselectieve antilichamen met daaraan gekoppeld een toxische stof (immuuntoxines).

Het antilichaam deel in een immuuntoxine herkent en bindt aan een target eiwit dat voornamelijk (maar niet uitsluitend) voorkomt op het celmembraan van kankercellen. In reactie hierop neemt de kankercel het gehele immuuntoxine op, waarna het toxine gedeelte zorgt voor de antikankeractiviteit. Sommige immuuntoxines laten daarbij veelbelovende selectiviteit en antikankeractiviteit zien. Helaas treden hierbij ook frequent ernstige bijwerkingen op bij normale cellen. Een probleem bij deze en vele andere benaderingen is namelijk dat de moleculen waarop een dergelijke therapie gericht is niet daadwerkelijk kankerspecifiek zijn. Authentiek kankerspecifieke target moleculen zijn voor de meeste vormen van kanker nog niet ontdekt of komen voor in onbruikbaar lage hoeveelheden. Bovendien wordt in de bovengenoemde therapieën gebruik gemaakt van toxines of chemotherapeutica die niet alleen uitermate toxisch zijn voor de kankercellen maar ook voor de normale cellen. Een bijkomende nadelige eigenschap van immuuntoxines is dat zij eerst actief in de cel moeten worden opgenomen om een effect te kunnen hebben,

terwijl een dergelijke opname in bepaalde gevallen juist verstoord is in kankercellen.

In dit promotieonderzoek is een volledig nieuwe benadering gekozen. Deze nieuwe strategie is er op gericht bepaalde apoptoseinducerende eiwitten af te leveren aan het celoppervlak van kankercellen. Met het oog op een aantal bijzondere en veelbelovende eigenschappen is hierbij gekozen voor twee apoptose inducerende eiwitten, TRAIL en FASL, die beide van nature voorkomen op cellen van het menselijke afweersysteem, zoals T-cellen en NK-cellen. Op deze cellen spelen TRAIL en FASL een belangrijke rol bij het selectief activeren van apoptose in onder meer virus geïnfecteerde cellen en kankercellen.

In bepaalde gevallen kan het extracellulaire deel van deze eiwitten van het celoppervlak afgeknipt worden, resulterend in oplosbare sTRAIL en sFASL varianten. Eerder is al aangetoond dat sTRAIL selectief apoptose kan induceren in allerlei typen kankercellen zonder daarbij schade te veroorzaken in normale gezonde cellen. Hoe deze uitzonderlijke intrinsieke selectiviteit voor een kanker cel tot stand komt is nog steeds niet volledig opgehelderd. Ook voor sFASL is kankerselectieve apoptose inductie beschreven, maar er zijn ook berichten, dat geaggregeerd (ofwel samengeklonterd) sFASL zeer toxisch is voor normale levercellen. Hiermee raakte sFASL als potentieel geneesmiddel op de achtergrond. Zoals echter later zal worden besproken heeft ons onderzoek, beschreven in **hoofdstuk 7**, aangetoond dat er wel degelijk goede mogelijkheden zijn om sFASL geschikt te maken voor therapeutische toepassingen bij bepaalde vormen van kanker.

Verschillende onderzoeksgroepen en bedrijven over de gehele wereld zijn bezig om sTRAIL geschikt en beschikbaar te maken voor klinische toepassingen. Ondanks de veelbelovende antikankeractiviteit van sTRAIL kleven aan het gebruik ervan in patiënten een aantal voorspelbare fundamentele problemen. Voor TRAIL zijn tenminste 4 verschillende TRAIL-receptoren gevonden waarvan er twee (TRAIL-R1 en TRAIL-R2) daadwerkelijk een apoptose signaal kunnen afgeven aan de kanker cel. Al deze verschillende TRAIL receptoren komen voor op vrijwel alle (normale) cellen in het menselijke lichaam. Hierdoor zal bij toediening van sTRAIL het overgrote deel van het toegediende eiwit kunnen binden aan de enorme overmaat van TRAIL-receptoren op gezonde cellen. De binding van sTRAIL aan deze normale cellen hoeft op zich niet per se schadelijk te zijn, maar het vermindert wel in zeer sterke mate de hoeveelheid sTRAIL die nog zal kunnen binden op de plek van de tumor. Wij voorspellen dan ook dat grote en wellicht onhanteerbare hoeveelheden sTRAIL zullen moeten worden toegediend om een therapeutisch effect te bewerkstelligen. Het is bovendien niet uit te sluiten dat bij dergelijke hoeveelheden toch sprake zal zijn van toxische effecten op gezonde cellen.

Een ander probleem is gelegen in het feit dat TRAIL-R1 en TRAIL-R2 verschillend

reageren op correct geproduceerd (trimeer) sTRAIL. TRAIL-R1 geeft een apoptotisch signaal af wanneer sTRAIL bindt aan de receptor. TRAIL-R2 daarentegen geeft alleen een efficiënt apoptotisch signaal af na binding van sTRAIL dat niet correct geproduceert is (multimeer). Tumoren die preferentieel TRAIL-R2 tot expressie brengen blijken derhalve relatief ongevoelig te zijn voor de huidige klinisch relevante sTRAIL preparaten.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het ontwikkelen van een strategie die de antikankeractiviteit van sTRAIL (en zoals later zal worden behandeld van sFASL) sterk verbetert. De door ons gevolgde strategie bestaat uit het genetisch koppelen van sTRAIL aan een kankerselectief antilichaam fragment (scFv). Het aldus geconstrueerde scFv:sTRAIL fusie-eiwit werd ontworpen om met sterk verhoogde selectiviteit en kracht te binden aan kankercellen, om vervolgens alleen lokaal, dus op de plaats van de kankercel, apoptose te activeren. Dit doel wordt onder andere bereikt door de bijzondere bindingseigenschappen van antilichamen. Antilichamen binden razend snel en specifiek aan het relevante target antigen. Eenmaal gebonden zal een antilichaam zeer lang gebonden blijven en soms pas na uren weer vrij komen van het target antigen. Binding van sTRAIL aan TRAIL-receptoren geschiedt ook zeer snel, maar anders dan bij een antilichaam valt het sTRAIL molecuul ook weer zeer snel van zijn receptor af. Op grond hiervan kan worden voorspeld dat conventionele sTRAIL preparaten niet zelfstandig kunnen ophopen op de plaats van de tumor. Dankzij het antilichaam component zal de sTRAIL component zoals aanwezig in het scFv:sTRAIL fusie-eiwit echter wel selectief gebonden blijven aan kankercellen en aldaar veel langer en dus vaker de TRAIL receptoren activeren.

Op grond van het bovenstaande voorspelden wij een aantal bijzondere eigenschappen van scFv:sTRAIL fusie eiwitten.

- Door te binden aan het target antigen op een geïsoleerd gelegen kankercel kan een scFv:sTRAIL fusie-eiwit de op de zelfde cel gelegen TRAIL-receptoren activeren tot apoptose (cellulaire zelfmoord of suïcide).
- Binding van scFv:sTRAIL aan het target antigen kan tevens leiden tot meercellige en wederzijdse interacties waarbij het fusie-eiwit als het ware een dodelijke brug vormt tussen kankercellen onderling. M.a.w. behandeling met scFv:sTRAIL leidt tot reciproque en versterkte activatie van het apoptose programma tussen twee of meer kankercellen (broedermoord ofwel fratricide).
- Bovendien kan de binding van scFv:sTRAIL aan het target antigen leiden tot meercellige interacties, waarbij het fusie-eiwit een dodelijke brug vormt met

kankercellen die zelf geen target antigen op het celoppervlak hebben. Dit effect wordt ook wel bystander effect genoemd.

Het een en ander is schematisch weergegeven in Fig.1 in **hoofdstuk 4**.

Het resultaat van onze aanpak is uiteraard afhankelijk van de keuze van het target antigen waaraan het scFv:sTRAIL fusie-eiwit selectief afgeleverd zal worden. Zoals hierboven reeds werd genoemd, zijn authentiek kankerspecifieke target antigenen zeer zeldzaam of niet beschikbaar. Een goed alternatief is dan een target antigen dat sterk verhoogd op kankercellen voorkomt en relatief weinig op normale cellen. In de laatste decennia is er een veelvoud van dit soort target antigenen geïdentificeerd dat mogelijk gebruikt kan worden voor onze strategie.

Om het werkingsmechanisme van onze nieuwe strategie te onderzoeken hebben we eerst een target antigen gekozen dat zelf geen directe rol speelt in het apoptose proces. De keuze viel daarbij op de Epithelial Glycoprotein-2 (EGP2), ook wel EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) genoemd. EGP2 komt sterk tot expressie op het celoppervlak van de meest frequente menselijke kankersoorten, zoals de epitheliale kankersoorten borstkanker en darmkanker, terwijl normale epitheliale cellen een veel lagere EGP2 expressie hebben. Vervolgens werd het eerste prototype fusie-eiwit geconstrueerd, genaamd scFvC54:sTRAIL, met daarin een antilichaam fragment dat specifiek kan binden aan EGP2.

Onderzoek naar het werkingsmechanisme van scFvC54:sTRAIL wordt in **hoofdstuk 3** beschreven. Uit dit onderzoek kwam duidelijk naar voren dat scFvC54:sTRAIL geheel volgens plan functioneerde. Behandeling van EGP2-positieve kankercellen leidde tot een sterke binding van scFvC54:sTRAIL aan het celoppervlak. Door de selectieve binding aan EGP2 werd het fusie-eiwit omgezet in een membraan gebonden variant van TRAIL, waardoor de TRAIL component zeer efficiënt zowel TRAIL-R1 als TRAIL-R2 activeerde. Dit alles resulteerde in versterkte en selectieve apoptose in kankercellen.

Vervolgens werd gekozen voor een target antigen dat juist wel een duidelijke integrale rol speelt in de gevoeligheid van kankercellen voor apoptose. Als klinisch relevant voorbeeld hiervan werd gekozen voor de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Verstoorde EGFR signalering is een vaak voorkomend fenomeen in solide tumoren en stimuleert celgroei, onder andere door actief de resistentie tegen apoptose te verhogen.

Inhibitie van EGFR signalering, door middel van een blokkerend monoklonaal antilichaam (b.v. Cetuximab) of een inhibitor van het intracellulaire signalerende domein van de EGFR (b.v. Iressa), remt kankergroei en herstelt bovendien gedeeltelijk de gevoeligheid voor

apoptose. Deze strategie is al in de kliniek onderzocht, voor zowel Cetuximab als Iressa, wat tot beperkt klinisch succes leidde.

Op basis hiervan hebben wij een scFv:sTRAIL fusie-eiwit ontworpen met specificiteit voor EGFR. In **hoofdstuk 5** zijn de resultaten van het onderzoek naar de werking van dit molecuul weergegeven. Behandeling van EGFR-positieve kankercellen met scFv425:sTRAIL resulteerde in specifieke binding van scFv425:sTRAIL aan de EGFR. Binding leidde bovendien tegelijkertijd tot een snelle remming van EGFR signalering met als gevolg dat de cel gevoeliger werd voor apoptose. Vervolgens activeerde het sTRAIL domein van het fusie-eiwit efficiënt apoptose. Het combineren van scFv425:sTRAIL met Iressa resulteerde bovendien in een nog verder versterkte apoptotische activiteit. Samenvattend, kan scFv425:sTRAIL van grote waarde zijn voor de behandeling van EGFR-positieve kanker soorten.

In de afgelopen jaren is er veel ervaring opgedaan in de kliniek met het toepassen van therapieën gebaseerd op antilichamen. Dat heeft geleid tot de identificatie van enkele problemen. Eén van de grote belemmeringen van antilichaam therapie is het feit dat kankercellen, die het antigen verliezen waartegen de therapie gericht is, niet meer herkend worden. Dergelijke kankercellen kunnen al tijdens de start van de therapie aanwezig zijn, maar kunnen zich ook tijdens de therapie ontwikkelen.

Door de bijzondere eigenschappen kan een scFv:sTRAIL fusie-eiwit ook een sterke apoptotische activiteit bezitten tegen kankercellen die het target antigen verloren hebben. In dit geval zorgt scFv:sTRAIL er namelijk voor, dat target antigen-positieve kankercellen de nabijgelegen target antigen-negatieve kankercellen tot apoptose dwingen; het zogeheten bystander effect.

Onderzoek naar de aard en efficiëntie van dit 'bystander effect' van scFv:sTRAIL is in **hoofdstuk 4** beschreven voor het EGP2-specifieke fusie-eiwit scFvC54:sTRAIL. Binding van scFvC54:sTRAIL aan EGP2 resulteerde in een zeer sterke activatie van apoptose in nabijgelegen EGP2-negatieve cellen. Het bystander effect was specifiek voor kankercellen en trad niet op tegen 'innocent' bystander cellen zoals normale gezonde bloedcellen. Enige voorwaarde voor dit antikanker 'bystander effect' is, dat de cellen functionele TRAIL-receptoren bezitten. Samenvattend kan dit bystander effect van scFv:sTRAIL fusie-eiwitten mogelijk van belang zijn om recidieven te voorkomen die kunnen ontstaan door verlies of heterogene expressie van het target antigen.

Deze preklinische data geven aan dat selectieve aflevering van sTRAIL naar kankercellen een veelbelovende therapeutische strategie kan zijn voor de behandeling van solide tumoren. De compactheid van de tumormassa in deze typen kanker kan echter de penetratie van scFv:sTRAIL fusie-eiwitten belemmeren. De toekomstige klinische

toepassing van scFv:sTRAIL fusie-eiwitten bij solide tumoren is dan ook waarschijnlijk gelegen in de behandeling van patiënten na cytoreductieve therapie, c.q. de behandeling van minimal residual disease.

Voor de toepassing van scFv:sTRAIL fusie-eiwitten voor de behandeling van leukemie (bloedkanker) zal deze problematiek van veel minder/geen invloed zijn, omdat dit type kanker gekenmerkt wordt door een diffuse groei. In het volgende deel van het proefschrift is dan ook onderzoek gedaan naar de toepasbaarheid en de effectiviteit van het selectief afleveren van sTRAIL naar leukemiecellen.

Leukemie wordt gekenmerkt door een kwaadaardige overproductie van witte bloedcellen. Afhankelijk van de soort witte bloedcel die de ziekte veroorzaakt, wordt er gesproken van lymfatische of myeloïde leukemie. De algemene therapie bij leukemie is intensieve chemo- en radiotherapie, eventueel gevolgd door beenmergtransplantatie. Helaas sterven nog ieder jaar betrekkelijk veel mensen, zowel volwassenen als kinderen, aan leukemie door de vaak zware bijverschijnselen en het optreden van resistentie.

Het ontwikkelen van verbeterde therapieën die selectief leukemiecellen elimineren is dus zeer gewenst. In **hoofdstuk 6** is onderzoek beschreven naar de haalbaarheid en effectiviteit van het toepassen van scFv:sTRAIL bij T-cel leukemie. T-cel leukemie is een van de typen leukemie waarbij de huidige behandelingsmethoden maar een zeer beperkt therapeutisch effect hebben en gepaard gaan met een significante morbiditeit. Derhalve is een scFv:sTRAIL fusie-eiwit ontworpen dat specifiek target naar het membraaneiwit CD7, een antigen dat vaak en hoog tot expressie komt op verschillende typen T-cel leukemie. Expressie van CD7 op gezonde cellen is gelimiteerd tot een subset van bloedcellen.

Het door ons ontworpen fusie-eiwit, scFvCD7:sTRAIL, bond selectief aan CD7, resulterend in een sterke activatie van apoptose in T-cel leukemiecellijnen. Belangrijker nog is het feit dat behandeling van leukemiecellen die direct geïsoleerd waren uit het bloed van patiënten, leidde tot veelbelovende apoptotische activiteit. In een rechtstreekse vergelijking met een CD7-specifiek immuuntoxine bleek het scFvCD7:sTRAIL fusie eiwit bovendien een sterkere antileukemische activiteit te bezitten. Dit terwijl de immuuntoxine, in tegenstelling tot scFvCD7:sTRAIL, een hoge ongewenste activiteit tegen normale CD7-positieve bloedcellen bezat. Daarnaast werd ontdekt dat de behandeling van cellen met scFvCD7:sTRAIL in combinatie met verschillende standaard chemotherapeutica resulteerde in een sterk verhoogde apoptotische activiteit. Hierdoor zullen bij combinatie met scFvCD7:sTRAIL de benodigde doses van dit soort chemotherapeutica verlaagd kunnen worden om eenzelfde therapeutisch effect te bereiken. Onze data tonen aan dat het toepassen van scFv:sTRAIL fusie-eiwitten voor de behandeling van leukemie een goede aanvulling kan zijn op bestaande conventionele therapieën.

In vergelijking met sTRAIL heeft het eerder vermelde eiwit sFASL een hogere intrinsieke apoptotische activiteit tegen kankercellen. Daartegenover staat dat sFASL in initiële experimenten, ernstige levertoxiciteit veroorzaakte in muizen. Recent is gebleken dat deze toxiciteit eigenlijk volledig te wijten is aan de incorrecte productie van sFASL, waardoor er eiwitaggregaten ontstaan. Onderzoek met recombinant sFASL heeft bovendien uitgewezen dat de antikankeractiviteit van sFASL pas geactiveerd wordt na vorming van grotere complexen op de kanker cel. Niet gecomplexeed (trimeer) sFASL bleek in feite geen biologische activiteit te bezitten tegen kankercellen. Dit in principe veelbelovende eiwit kan dus alleen succesvol worden toegepast als sFASL uitsluitend op de plek van de tumor kan worden geactiveerd.

Op basis van deze gegevens voorspelden wij dat het genetisch koppelen van sFASL aan een tumorspecifiek scFv antilichaam fragment zou resulteren in een dergelijke lokale activatie van sFASL. Derhalve werd door ons een scFv:sFASL fusie-eiwit ontworpen. Het antilichaam fragment van een dergelijk scFv:sFASL fusie eiwit zal snel en specifiek aan het relevante target antigen binden en, zodra gebonden, ook langdurig gebonden blijven. De sFASL component van het scFv:sFASL fusie-eiwit zal dankzij deze binding van het antilichaam fragment lokaal omgezet worden in een membraangebonden FASL. Hierdoor wordt scFv:sFASL lokaal actief, waarna apoptose geïnduceerd wordt in de leukemiecél via de receptor FAS.

Het onderzoek naar de effectiviteit van een dergelijk scFv:sFASL fusie-eiwit gericht tegen het antigen CD7 wordt in **hoofdstuk 7** beschreven. Uit dit onderzoek bleek duidelijk dat dit scFvCD7:sFASL fusie-eiwit lokaal een sterke antileukemische activiteit bezat. Selectieve binding van scFvCD7:sFASL aan CD7 resulteerde in een sterke activering van apoptose in CD7-positieve leukemische cellijnen. Van groot belang is dat scFvCD7:sFASL ook sterk apoptose induceerde in leukemische cellen die geïsoleerd waren uit patiëntenbloed. De activiteit van scFvCD7:sFASL werd bovendien in belangrijke mate versterkt door het fusie-eiwit te gebruiken in combinatie met verschillende conventionele chemotherapeutica en andere nieuwe experimentele middelen.

Door het selectief afleveren van sFASL naar CD7 bezit dit fusie eiwit ook een sterk anti-leukemisch 'bystander' effect tegen leukemiecellen die CD7-negatief zijn. Tegen normale gezonde cellen is dit fusie eiwit grotendeels inactief; alleen geactiveerde T cellen bleken enigszins gevoelig te zijn voor scFvCD7:sFASL. Dit is echter in lijn met de verwachting, aangezien FASL normaal een belangrijke rol speelt bij het elimineren van geactiveerde T-cellen tijdens de afschakeling van een immuunrespons. Samenvattend vormen de preklinische data beschreven in dit hoofdstuk een sterke aanwijzing dat de lokale

activering van sFASL door middel van scFvCD7:sFASL een veelbelovende therapeutische strategie kan zijn voor de behandeling van CD7-positieve leukemiën.

In **hoofdstuk 8** wordt een korte samenvatting gegeven van de resultaten die beschreven zijn in de **hoofdstukken 3** tot en met **7**, waarbij tegelijkertijd de perspectieven voor de verdere ontwikkeling van deze therapeutische strategie besproken worden.
