

Projekt

RNA-reprogrammierte T-Zellen – der Schritt aus dem Reagenzglas in den Patienten

Projektleitung

Niels Schaft, PhD

Dr. rer.nat. Jan Dörrie

PD Dr. med. Beatrice Schuler-Thurner

Universitätsklinikum Erlangen
Hautklinik
Hartmannstraße 14
91052 Erlangen

Tel: 0 91 31 / 85 – 3 11 27

Fax: 0 91 31 / 85 – 3 29 31

niels.schaft@uk-erlangen.de
jan.doerrie@uk-erlangen.de
beatrice.schuler-thurner@uk-erlangen.de

www.hautklinik.uk-erlangen.de



Projektfortschritt 2011

Tumorwachstum kann durch zytotoxische T-Zellen (CTL) unterdrückt werden. Die Immuntherapie von Krebs durch adoptiven Transfer autologer tumor-spezifischer CTL wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass die Isolierung hoch-avider funktioneller CTL nur bei wenigen Patienten gelingt. Um dies zu überwinden, können spezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer dadurch erzeugt werden, dass diese durch den Einbau chimärer Antigenrezeptoren (CAR) eine neue Spezifität erhalten, was bisher durch retrovirale Transduktion erreicht wurde. Letztere kann von Nachteil sein, wenn ungewollte (Kreuz-) Reaktionen des Rezeptors auftreten, die zu schwerer Autoimmunität führen. Eine neue innovative Alternative zur retroviralen Transduktion ist die Elektroporation von mRNA. Voraussetzung zur klinischen Anwendung dieser Methode ist jedoch die Etablierung einer Technologieplattform um T-Zellen in großer Menge und entsprechender Qualität durch RNA-Elektroporation mit einem CAR zu reprogrammieren.

Zur Behandlung eines Patienten wird eine Milliarde elektroporierte T-Zellen benötigt, weshalb die isolierten T-Zellen zuerst moderat vermehrt werden müssen. Isolation und Stimulation von T-Zellen aus PBMCs gesunder Spender mit anti-CD3- und anti-CD28-beschichteten Dyna-Beads führte zu einer heftigen Expansion (46 - 75-fach) während die nicht-adhärenente Fraktion (NAF) aus gesunden Spendern und eines Melanompatienten nach Stimulation mit anti-CD3 (OKT-3) und IL-2 etwas schwächer (13-38-fach bzw. 44-fach) expandierte. Die Verwendung von Dyna-Beads bedingt jedoch Prozessschritte, die sich schwer unter GMP durchführen lassen. Außerdem sollte eine zu extensive Expansion der T-Zellen vermieden werden, da diese zu Anergie und Seneszenz führen kann. Gegenstrom-Elutriation ist zum Anreichern von großen Mengen an T-Zellen aus Leukapherese-Produkten unter GMP-Bedingungen gut geeignet. Wir testeten diese Methode mit Zellen aus 4 Melanompatienten, stimulierten die Zellen mit OKT-3 und IL-2, und beobachteten eine Vermehrung um den Faktor 1,9 – 4,4. Trotz der prinzipiellen technischen Machbarkeit, erfordert die niedrige Expansionsrate eine weitere Verbesserung des Protokolls.

Da ein großer Anteil aller Melanome das Glykoprotein MCSP stark exprimiert (sowohl die Tumorzellen als auch die Perizyten im Tumor), gesundes Gewebe MCSP jedoch nur sehr eingeschränkt exprimiert, wurde ein MCSP-spezifischer CAR verwendet. Ein hoher Anteil (>70 %) der NAF-Zellen gesunder Spender, die 10 Tage mit OKT-3 und IL-2 expandiert und dann mit mRNA elektroporiert wurden, die den MCSP-spezifischen CAR kodierte, exprimierten diesen auf ihrer Oberfläche.

Bei Stimulation mit MCSP-tragenden Tumorzellen produzierten diese T-Zellen die Zytokine IL-2, TNF und IFN γ und zeigten lytische Aktivität, wodurch ihre Funktionalität gezeigt wurde. Die CAR-transfizierten T-Zellen aus Patientenmaterial lysierten ebenfalls MCSP-positive Tumorzelllinien. Interessanterweise zeigten in-vivo-Experimente, dass immundefiziente Mäuse, denen Tumorzellen zusammen mit CAR-transfizierten T-Zellen injiziert wurden, eine durchschnittliche Überlebenszeit von 48,7 d hatten, während diese bei Kontrollmäuse mit leer-elektroporierten T-Zellen signifikant kürzer (41,5 d) war. Diese in-vivo-Experimente sollen nun auf die therapeutische Situation ausgedehnt werden.

Zusammengefasst haben wir gezeigt, dass die Produktion RNA-reprogrammierter T-Zellen in einen GMP-kompatiblen, klinisch anwendbaren Prozess übertragen werden kann, der jedoch noch weiterer Feinabstimmung bedarf.

April 2011