

Abschlussbericht für das Projekt

Etablierung autologer NK-Zell-basierter In-vitro-Zytotoxizitäts-Assays zur Untersuchung des Einflusses von *Immune Checkpoint* Inhibitoren auf die antileukämische Zytotoxizität

Stand der Forschung und Ergebnisse

Obwohl das Immunsystem grundsätzlich in der Lage ist, entartete Zellen als fremd zu erkennen und zu eliminieren, erlangt das Tumorwachstum durch den so genannten Immune Escape häufig die Oberhand und entgeht der Überwachung durch das Immunsystem, wodurch es zur Tumorprogression kommt (Barber et al, Nature 2006;429; Ahmadzadeh et al, Blood 2009;114). Ein Mechanismus des Immune Escape ist die verstärkte Expression von negativen Immunregulatoren, so genannten Immune Checkpoint Molekülen, was zu einer verminderten Aktivität der Immunzellen im Tumormikromilieu führt. Blockierende Antikörper gegen die Immune Checkpoint Moleküle CTLA-4 oder PD-1 sind klinisch bereits zugelassen und viele weitere Immune Checkpoint Molekül-Achsen befinden sich derzeit in klinischer Erprobung (Hodi et al, N Engl J Med 2010;363; Fan et al, Oncol Rep 2019;41). Die Eigenschaften der AML Zellen selbst, die Komplexität der immunologischen Prozesse, Beteiligung verschiedener Immunzellen (T-Zellen, NK-Zellen, tumor-assoziiertes Makrophagen) sowie die große Anzahl unterschiedlicher Immune Checkpoint Moleküle erschwert die Identifizierung der therapeutisch relevanten Moleküle für AML Patienten.

Natürliche Killer (NK) Zellen stellen einen wichtigen Teil der Immunüberwachung gegenüber Krebszellen dar. Als Teil des angeborenen Immunsystems verfügen sie über eine intrinsische Selektivität gegenüber ihrer Zielmoleküle, wodurch ihre Immunantwort deutlich schneller als die von T-Zellen einsetzt, was sie zu interessanten immuntherapeutischen Zielzellen macht.

Wir konnten durch eine intensive immunphänotypische Charakterisierung der NK-Zellen aus Proben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) aufzeigen, dass die TIGIT/PVRIG Immune Checkpoint Achse sowie Mitglieder des purinergeren Signalling eine erhöhte Expression im Vergleich zu NK-Zellen aus gesunden Spendern aufwiesen. Darüber hinaus konnten wir mithilfe einer NK-Zell-Zelllinie und verschiedenen AML-Zelllinien nachweisen, dass die kombinierte Blockade der TIGIT- und purinergeren Signalkaskade zu einer verstärkten NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität führen.

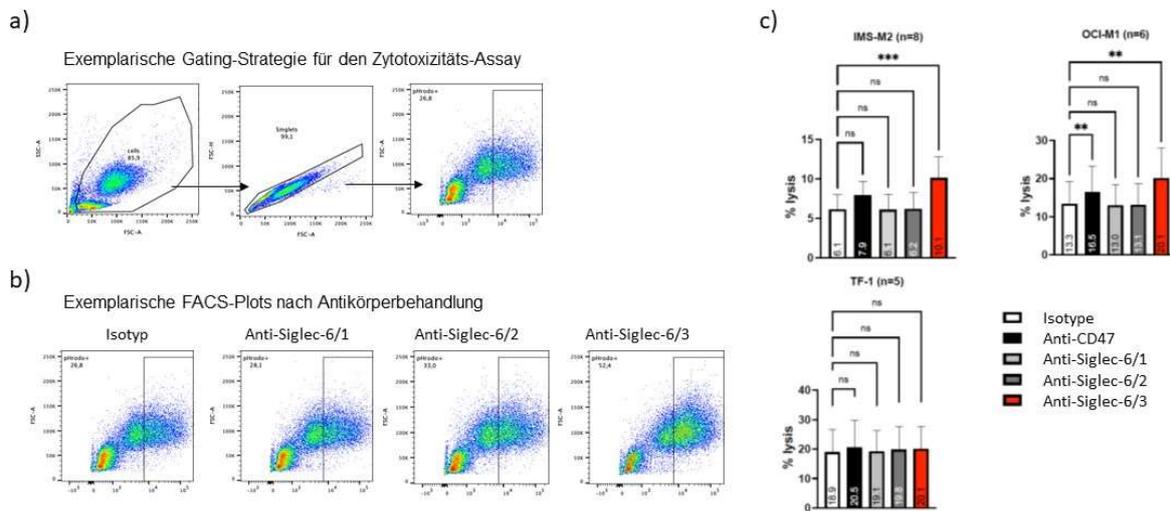
Das Lektin Siglec-6 (sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 6) könnte zudem ein sehr interessantes Zielmolekül in der AML darstellen. Chang et al. untersuchten das Antikörper-Repertoire von jenen Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), die zuvor eine allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) erhalten hatten. Das Antikörper-Repertoire wurde auf primären CLL-Proben selektioniert und weitere Analysen zeigten, dass Antikörper gegen Siglec-6 in den Post-alloHSCT-Patienten stark angereichert waren, was darauf hindeutet, dass Siglec-6 ein therapeutisches Target darstellen könnte (Chang et al, Cancer Immunol Res 2018;6(9)). In einer weiteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass bi-spezifische Antikörper, die sich gegen Siglec-6 auf Tumorzellseite und CD3 auf T-Zellseite richteten, ebenfalls effizient CLL-Zellen eliminieren (Cyr et al, J Immunother Cancer 2022;10(11)). Darüber hinaus zeigten gegen Siglec-6-gerichtete CAR T-Zellen, die auf Grundlage der Antikörper aus den zuvor beschriebenen Studie basierten, in vitro als auch in vivo in einem CLL-Xenograft-Mausmodell starke anti-leukämische Effekte zeigte (Kovalovsky et al, Leukemia 2021;35(9)). Ähnlich aussichtsreiche Daten konnten in vitro und in vivo mit gegen Siglec-6-gerichteten CAR T-Zellen in der AML erreicht werden (Jetani et al, Blood 2021;138(19)). Ein entscheidender Faktor hierbei ist, dass mehrere Studien beschrieben haben, dass Siglec-6 auf gesunden hämatopoietischen Stammzellen nicht exprimiert wird, wodurch hämatotoxische Nebenwirkungen reduziert werden könnten (Kovalovsky et al, Leukemia 2021;35(9); Jetani et al, Blood 2021;138(19)).

Das Ziel des geplanten Projektes war die Evaluation immuntherapeutischer Targets in NK-Zell-basiereten Zytotoxizitäts-Assays, wobei das Ziel die Etablierung autologer NK-Zell-Assays mit primären mononukleären Zellen des Knochenmarks sein sollte.

Da wir Siglec-6 für eine besonders aussichtsreiche Zielstruktur halten, konzentrierten sich unsere Analysen zunächst auf die Evaluation des therapeutischen Potentials von Siglec-6 mithilfe einer NK-Zell-Zelllinie (NK92) und AML-Zelllinien. In den Assays kamen verschiedene anti-Siglec-6 Antikörper zum Einsatz, welche von unserer Kooperationspartnerin Prof. Dr. Sophia Karagiannis (King's College London) zur Verfügung gestellt wurden. Bei dem Antikörper Anti-Siglec-6/3 handelt es sich um eine optimierte Variante, von der wir die stärksten Effekte in den Antikörper-vermittelten Zytotoxizitäts-Assays (ADCC, Antibody-dependant cellular cytotoxicity) erwartet hatten, was sich bestätigte. Die NK-Zellen und AML-Zellen wurden jeweils für 3h co-kultiviert und mit blockierenden Antikörpern oder einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle inkubiert, bevor der Anteil lysierter AML-Zellen mittels eines Lebend-Tot-Farbstoffs durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

Abbildung 1a zeigt exemplarisch die Gating-Strategie für die Zytotoxizitäts-Assays, wobei zunächst auf die Zellpopulationen gated wird (links), Dupletten ausgeschlossen werden (mittig), bevor schließlich mittels Lebend-Tot-Farbstoff der Anteil lysierter Zellen ermittelt wird (rechts). In Abbildung 1b sind exemplarisch die FACS-Plots eines Blocking-Versuchs mit Anti-Siglec-6 Antikörpern vs. Isotyp Antikörper dargestellt. Abbildung 1c zeigt die Durchschnittswerte aus mehreren Zytotoxizitäts-Assays für die AML-Zelllinien IMS-M2, OCI-M1 und TF-1. Ein Anti-CD47 Antikörper wurde als Positivkontrolle für den ADCC-Assay eingesetzt. Es zeigte sich, dass der Anti-Siglec-6/3 Antikörper die stärksten anti-leukämischen Effekte vermitteln konnte.

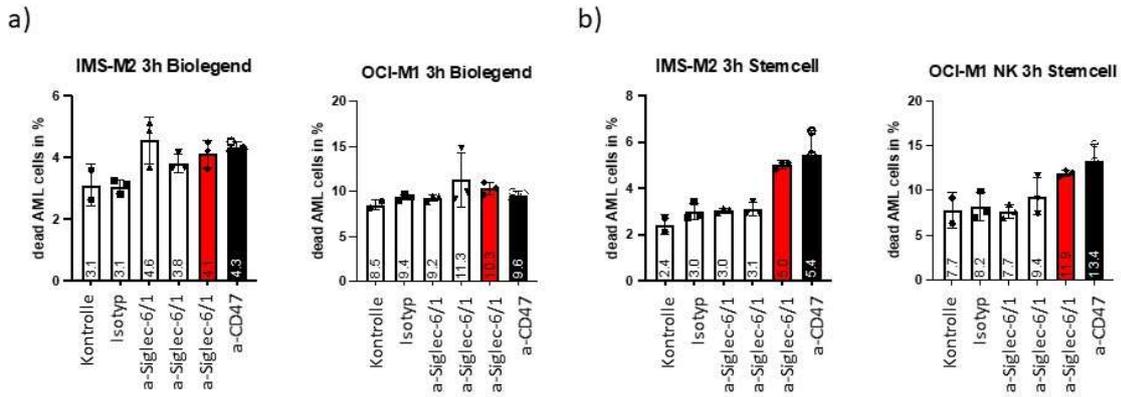
Abbildung 1. NK92-basierte ADCC-Assays.



ns=nicht signifikant, **p<0,001, *** p<0,001

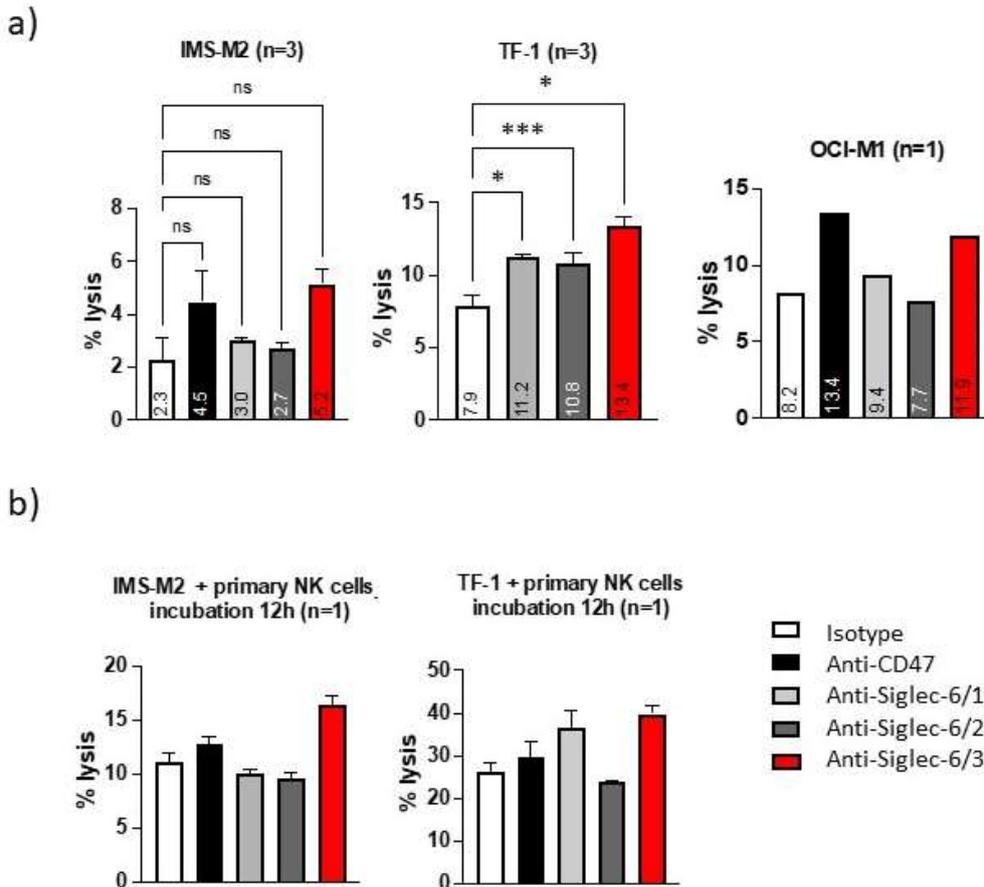
Es gibt verschiedene Isolationskits für NK-Zellen auf dem Markt. Für die Etablierung der Assays mit primären NK-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender haben wir verschiedene Kits ausgetestet. Abbildung 2 zeigt deutlich, dass das Kit der Firma Stem Cell (b) dem Kit der Firma Biolegend (a) überlegen ist, was die Fähigkeit der NK-Zellen AML-Zellen zu lysieren angeht. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Assays mit dem Kit der Firma Stem Cell durchgeführt.

Abbildung 2. Effekte unterschiedlicher NK-Zell-Isolationskits



Ein weiterer Optimierungsschritt mit primären NK-Zellen gesunder Spender und AML-Zelllinien umfasste die Inkubationszeit. Nach der für die Zelllinie NK92-etablierten Inkubationszeit von 3h, war der Anteil lysierter AML-Zellen sehr gering, weshalb die Inkubationszeit verlängert wurde. Abbildung 3 zeigt den Vergleich zwischen einer Inkubationszeit von 3h (a) vs. 12h (b) für mehrere AML-Zelllinien. Da der Anteil lysierter Zellen nach 12h signifikant höher als nach 3h ist, sollen alle folgenden Assays mit einer Inkubationszeit von 12h durchgeführt werden.

Abbildung 3. Optimierung der Inkubationszeit.



ns=nicht signifikant, * p<0,05, *** p<0,001

Ausblick

Derzeit arbeiten wir an der Übertragung des Assays auf primäre AML-Proben, was bedeutet, dass sowohl primäre AML-Blasten aus dem Knochenmark der AML-Patienten isoliert werden müssen (z.B. über die Marker CD33, CD34, CD117) als auch autologe primäre NK-Zellen. In einer anschließenden Co-Kultur werden die Ansätze mit blockierenden Antikörpern gegen Siglec-6 und andere Zielmoleküle wie CD47 oder CD38 inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der lysierten Zellen soll auf Grundlage der generierten Vordaten nach 12h erfolgen.

Parallel zu den funktionellen Assays ist eine detaillierte multiparametrische FACS-Analyse einer Kohorte von AML-Patienten geplant, bei der die NK-Zellen im Detail charakterisiert werden sollen, wir aber gleichzeitig auch die Expression aussichtsreicher Leukämie-Targets wie Siglec-6, CD47 oder CD38 auf den Leukämieblasten und gesunden hämatopoietischen Vorläuferzellen der Patienten untersuchen wollen. Diese Daten sollen die Grundlage für weitere funktionelle Analysen darstellen, bei denen wir die Blockade verschiedener Zielstrukturen kombinieren wollen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir durch die Förderung der Hamburger Krebsgesellschaft in der Lage waren, ADCC-Assays mit primären NK-Zellen in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren. Darüber hinaus hat die Förderung maßgeblich dazu beigetragen, dass wir zeigen konnten, dass Siglec-6 eine erfolgsversprechende Zielstruktur für NK-Zell-basierte immuntherapeutische Ansätze darstellt.

Wir möchten uns daher auf diesem Wege noch einmal recht herzlich für die Förderung bedanken.

Datum und Unterschriften der Projektleiter

Hamburg, den 25.07.2024



Ort, Datum, Unterschrift

(Dr. Franziska Brauneck)

(Dr. Jasmin Wellbrock)