

OPEN ACCESS

**Repository of the Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC)
in the Helmholtz Association**

<http://edoc.mdc-berlin.de/14956>

**Designer T cells - New possibilities for immunotherapy of cancer
[Designer-T-Zellen - neue Moeglichkeiten fuer die Immuntherapie von
Krebs]**

Leisegang, M., Uckert, W.

This is the final version of the manuscript. The original article has been published in final edited form in:

BIOspektrum
2015 JUN 20 ; 21(4): 402-405
[Springer Verlag](#)

The final publication is available at Springer via: <http://dx.doi.org/10.1007/s12268-015-0594-7>

"Designer"-T-Zellen: Neue Möglichkeiten für die Immuntherapie von Krebs

Matthias Leisegang und Wolfgang Uckert

Molekulare Zellbiologie und Gentherapie, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

The genetic engineering of T cells with T cell or chimeric antigen receptors generates tumor-specific "Designer" T cells for immunotherapy of cancer. The clinical use of these cells requires (i) careful selection of the target antigen that should be tumor-specific, (ii) an optimized configuration of therapeutic genes, to generate T cells of high functional activity and (iii) efficient vector systems that allow the generation of sufficient numbers of engineered T cells within a short period of time.

T-Zellen sind ein natürlicher Teil des Immunsystems. Ihre Eigenschaft, veränderte Zellen spezifisch erkennen und zerstören zu können, lässt sich für eine Form der zellulären Immuntherapie nutzen, die als adoptive T-Zelltherapie bezeichnet wird und den Transfer einer definierten T-Zellpopulation in den Patienten darstellt.

T-Zellen können Tumorzellen zerstören

Ähnlich wie virusinfizierte Zellen, die sich durch die Expression körperfremder Virusproteine von Normalzellen unterscheiden, zeigen auch Tumorzellen eine veränderte Proteinexpression. Fragmente, der in einer Tumorzelle exprimierten Proteine (Peptide), werden auf der Zelloberfläche durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *major histocompatibility complex*) präsentiert. Bindet eine T-Zelle mithilfe des T-Zellrezeptors (TZR) an einen Peptid:MHC-Komplex und wird das präsentierte Peptid als "fremd" erkannt, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Die T-Zelle induziert mithilfe zytotoxischer Mechanismen die Zerstörung der Tumorzelle und sezerniert inflammatorische Zytokine. Der für die Erkennung der Zielstruktur (Antigen) notwendige TZR-Komplex besteht aus der α - und β -Kette des TZR und dem CD3-Komplex, der den TZR stabilisiert und die Funktion der Signalübertragung übernimmt (Abb. 1A).

Tumorspezifische T-Zellen des Patienten

Das Immunsystem eines Krebspatienten kann über tumorspezifische T-Zellen verfügen, doch ist die Funktion dieser T-Zellen stark eingeschränkt [1,2]. Der klinische Einsatz von Antikörpern, die die Inhibierung von T-Zellen aufheben (sogenannte Checkpoint-Hemmer), kann zur Aktivierung der

tumorspezifischen T-Zellen eines Patienten führen. Es hat sich gezeigt, dass die induzierten T-Zellen Peptid:MHC-Komplexe erkennen, die sogenannte Mutationsantigene (Peptide aus mutierten Proteinen) präsentieren [3]. Mutationen verursachen die Entartung normaler Körperzellen und sind damit ursächlich für das Tumorwachstum. Sie unterscheiden Krebs- von ihren normalen Vorläuferzellen und geben T-Zellen die Möglichkeit, den Tumor als "fremd" zu erkennen. Neben der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen durch den Einsatz von Checkpoint-Hemmern besteht die Möglichkeit, T-Zellen aus dem Körper zu entnehmen, *ex-vivo* zu aktivieren und therapeutisch einzusetzen (adoptive T-Zelltherapie). Sehr erfolgreich ist diese Form der zellulären Immuntherapie im Rahmen der Transplantationsmedizin, wo sie bei der Behandlung virusassoziierter Tumoren Anwendung findet. Hier wird durch die einzigartige Spezifität der T-Zellen für die von Krebszellen präsentierten Virusantigene ein sehr hoher Wirkungsgrad erreicht [4]. Für die Behandlung anderer Krebserkrankungen sind tumorreaktive T-Zellen nicht so einfach zu gewinnen. Meist lassen sich keine spezifischen T-Zellen aus dem Patienten isolieren oder die für den Transfer benötigte Menge an T-Zellen kann nicht in der notwendigen Zeit hergestellt werden. Der adoptive Transfer körpereigener, *ex-vivo* expandierter T-Zellen erreicht bisher nur bei einem Teil von Patienten mit metastasierendem Hautkrebs eine langanhaltende Tumorregression [5]. Interessant ist, dass sich auch bei diesen Patienten T-Zellen finden, die Mutationsantigene auf den Hautkrebszellen erkennen [6].

Herstellung von "Designer"-T-Zellen

Die Kombination verschiedener Techniken aus den Bereichen der Molekularbiologie, Immunologie und Virologie macht es möglich, tumorspezifische T-Zellen für die adoptive T-Zelltherapie gezielt herzustellen. Normale T-Zellen eines Patienten werden dafür mit tumorspezifischen Rezeptoren ausgestattet und somit befähigt, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Dafür können zum einen die Gene tumorspezifischer TZR (Abb. 1A) in T-Zellen eingebracht werden (TZR-Gentherapie). Die T-Zelle verfügt dann zusätzlich zu ihrem eigenen (endogenen) TZR über einen weiteren TZR, der der T-Zelle eine Tumorspezifität verleiht. Solche "therapeutischen" TZRs können aus tumorreaktiven T-Zellen gewonnen werden, die z.B. aus Krebspatienten isoliert oder durch Immunisierung von bestimmten Mausstämmen mit Tumorantigenen erzeugt wurden [7]. Eine weitere Möglichkeit, T-Zellen mit einem tumorspezifischen Rezeptor auszustatten, ist das Einbringen eines synthetischen Gens, das für einen chimären Antigenrezeptor (CAR) kodiert. Ein CAR-Molekül besteht aus drei Komponenten: (i) einem extrazellulären, antigenbindenden Antikörperfragment, das die gewählte Zielstruktur auf der Tumorzelle detektiert; (ii) einem Transmembranteil, welcher den CAR in der

Membran der T-Zelle verankert, und (iii) einem intrazellulären Teil, der die Antigenbindung als aktivierendes Signal in das Innere der T-Zelle weiterleitet (Abb. 1B). Im Gegensatz zur adoptiven T-Zelltherapie mit *ex-vivo* expandierten T-Zellen bringt die Verwendung von "Designer"-T-Zellen die Herausforderung mit sich, ein definiertes Tumorantigen als Zielstruktur zu wählen. Erste Erfahrungen wurden mit TZR-modifizierten T-Zellen gemacht, die Peptide nicht-mutierter Proteine (sogenannte Selbstantigene) auf Tumorzellen erkennen. Bedingt durch ihre Entartung werden in Tumorzellen auch einige normale Proteine in veränderter Menge exprimiert. Diese Selbstantigene lassen sich nur unter einer Voraussetzung als Zielstruktur nutzen: sie dürfen nicht in lebensnotwendigen Geweben exprimiert werden. Der adoptive Transfer selbst-reaktiver T-Zellen führt sonst zu schwersten Nebenwirkungen [8]. Als eine Ausnahme ist sicher die Verwendung CAR-modifizierter T-Zellen zu sehen, die das Oberflächenmolekül CD19 erkennen. CD19 befindet sich auf B-Zellen und aus ihnen hervorgehenden Tumoren. Der Transfer dieser T-Zellen bewirkt zum einen die effektive Zerstörung CD19-exprimierender B-Zelltumoren, eliminiert jedoch ebenfalls die normalen B-Zellen des Patienten [9]. Der Verlust normaler B-Zellen kann jedoch substituiert werden. Vielversprechend sind gegenwärtige Bestrebungen Mutationsantigene als Zielstrukturen der TZR-Gentherapie zu nutzen. "Therapeutische" T-Zellen, die allein Tumorzellen erkennen und zerstören, versprechen erstmals eine wirksame Krebstherapie, die ohne schwerwiegende Nebenwirkungen auskommt [10].

Jedes Detail zählt

Die Herstellung von "Designer"-T-Zellen ist technisch sehr anspruchsvoll. Die Funktion CAR-modifizierter T-Zellen wird u.a. durch die Affinität des antigenbindenden Antikörperfragments, die Länge der Transmembranregion und die Signaltransduktionselemente bestimmt. Bei der Herstellung TZR-modifizierter T-Zellen muss darauf geachtet werden, dem „therapeutischen“ TZR einen Vorteil gegenüber dem endogenen TZR zu geben, da beide in Konkurrenz um die Proteine des CD3-Komplexes und damit um die Präsentation auf der Zelloberfläche stehen [11]. Wir konnten eine Methode entwickeln, die die Expression des endogenen TZR vollständig verhindert. Die so hergestellten TZR-modifizierten T-Zellen sind allein spezifisch für das gewählte Tumorantigen und werden nicht durch Interferenzen von endogenem und "therapeutischem" TZR beeinträchtigt [12]. Die Genfähre (Vektor), mit der die Gene für CARs oder TZR in T-Zellen übertragen werden, muss so gewählt werden, dass der Transfer möglichst effektiv erfolgt. Zudem müssen die transferierten Gene effizient exprimiert werden, da eine große Menge an CAR- bzw. TZR-Molekülen auf der Oberfläche der T-Zellen für deren Funktionalität notwendig ist. Diese Voraussetzungen werden gegenwärtig am

besten von Vektoren erfüllt, die sich von Retro- und Lentiviren ableiten (Abb. 2A). Nicht-virale Gentransfersysteme, wie z.B. Transposon-basierende Vektoren, bieten jedoch eine aussichtsreiche Alternative, um ohne die aufwendige Produktion viraler Vektorpartikel mutationsspezifische TZR-Gene flexibel für die therapeutische Anwendung einsetzen zu können. Desweiteren muss die notwendige Anzahl an "therapeutischen" TZR- oder CAR-modifizierten T-Zellen innerhalb kurzer Zeit hergestellt werden, da sonst wichtige Eigenschaften der T-Zellen verloren gehen, die für den Erfolg der adoptiven T-Zelltherapie notwendig sind (Abb. 2B). Dies macht aufwendige Zellkulturtechniken erforderlich.

Individualisierte Medizin

Da für die Herstellung von TZR- oder CAR-modifizierten T-Zellen dem Patienten T-Zellen entnommen, *ex-vivo* modifiziert und anschließend wieder zurückgegeben werden (Abb. 3), sind "Designer"-T-Zellen Bestandteil einer individualisierten Therapie. Neben den bereits zitierten klinischen Befunden [3,6] geben auch experimentelle Tiermodelle gesicherte Erkenntnisse, dass Mutationsantigene die vielversprechendsten Zielstrukturen für eine Therapie mit genetisch modifizierten T-Zellen darstellen [13]. Da sich die Mutationen in einem Tumor von Patient zu Patient unterscheiden, verlangt eine mutationsspezifische T-Zelltherapie nach einem hoch-individualisierten und vielschichtigen Therapieansatz, dem wir uns im Rahmen eines Konsortiums in Zusammenarbeit mit verschiedenen Partnern widmen (<http://www.bihealth.org/de/forschung/forschungsprojekte/t-zell-gentherapie-bei-krebs/>). Mithilfe neuartiger Sequenzierungstechniken können die Mutationen eines Tumors schnell definiert werden, doch sind weitere Analysen notwendig, um sicherzustellen, dass sich eine Mutation als Tumorantigen manifestiert und von T-Zellen erkannt werden kann. Anschließend müssen mutationsspezifische TZRs gewonnen und in geeignete Vektoren eingebaut werden, um sie schließlich therapeutisch einsetzen zu können. Des Weiteren ist die Evaluierung "therapeutischer" T-Zellen im Tiermodell notwendig, um einen klinischen Misserfolg zu vermeiden. Sowohl die Herstellung der Vektoren als auch die Modifikation der T-Zellen mit TZR- oder CAR-Genen unterliegt strengen Regularien. Die Verwendung von mutationsspezifischen "Designer"-T-Zellen für die Immuntherapie von Krebs ist daher im notwendigen Zeitrahmen schwer umzusetzen und derzeit noch sehr kostenintensiv.

Literatur

- [1] Schietinger A, Delrow JJ, Basom RS *et al.* (2012) Rescued tolerant T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science* 335:723-727

- [2] Willimsky G and Blankenstein T (2005) Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141-146
- [3] van Rooij N, van Buuren MM, Philips D *et al.* (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31:439-442
- [4] Heslop HE, Slobod KS, Pule MA *et al.* (2010) Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115:925-935
- [5] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM *et al.* (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17:4550-4557
- [6] Robbins PF, Lu Y-C, El-Gamil M *et al.* (2013) Mining exome sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19:747-752
- [7] Obenaus M, Leitao C, Leisegang M *et al.* (2015) Identification of human T-cell receptors with optimal affinity to cancer antigens using antigen-negative humanized mice. *Nat Biotechnol* 33:402-407
- [8] Hinrich CS and Restifo NP (2013) Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nat Biotechnol* 31:999-1008
- [9] Maude SL, Frey N, Shaw PA *et al.* (2014) Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med* 371:1507-1517
- [10] Blankenstein T, Leisegang M, Uckert W *et al.* (2015) Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *Curr Opin Immunol.* 33:112-119
- [11] Uckert W and Schumacher TNM (2009) TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008. *Cancer Immunol Immunother* 58:809-822
- [12] Bunse M, Bendle GM, Linnemann C *et al.* (2014) RNAi-mediated TCR knockdown prevents autoimmunity in mice caused by mixed TCR dimers following TCR gene transfer. *Mol Ther* 22:1983-1991
- [13] Schreiber K, Rowley DA, Riethmüller G *et al.* (2006). Cancer immunotherapy and preclinical studies: why we are not wasting our time with animal experiments. *Hematol Oncol Clin N Am* 20:567-584

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Wolfgang Uckert

Dr. Matthias Leisegang

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Robert-Rössle-Straße 10

13092 Berlin

wuckert@mdc-berlin.de, matthias.leisegang@mdc-berlin.de

Kurzvitae

Matthias Leisegang: 1999-2005 Biologiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2011 Promotion. Seit 2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter, zunächst am Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin und seit 2014 am Institut für Immunologie der Charité, Campus Buch.

Wolfgang Uckert: 1970-1974 Chemiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin. 1980 Promotion. 1990 Habilitation. Seit 2002 Inhaber des Lehrstuhls für Molekulare Zellbiologie und Gentherapie an der Humboldt Universität zu Berlin, Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin.

Abbildungen

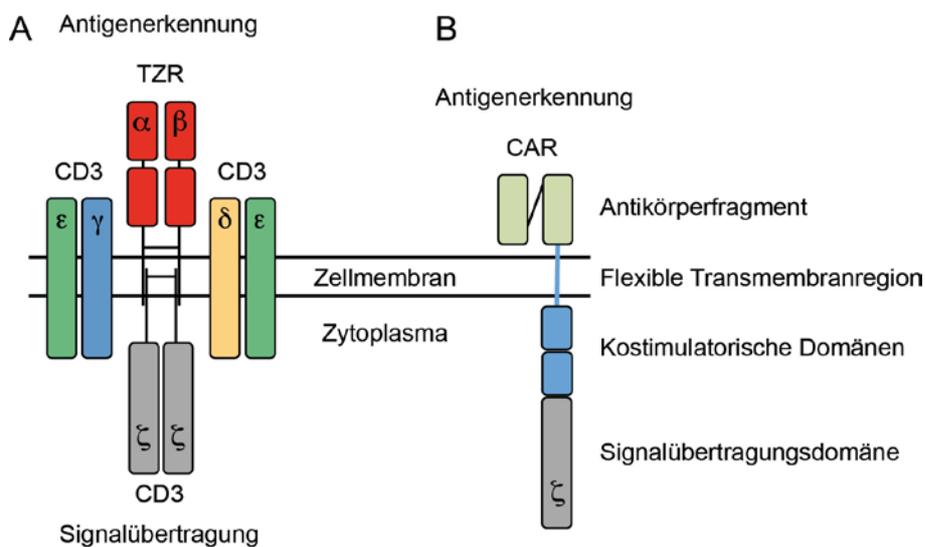


Abb. 1

Schematische Darstellung eines (A) T-Zellrezeptor (TZR)-Komplexes, bestehend aus der TZR α - und β -Kette und den Proteinen des CD3-Komplexes und (B) eines chimären Antigenrezeptors (CAR).

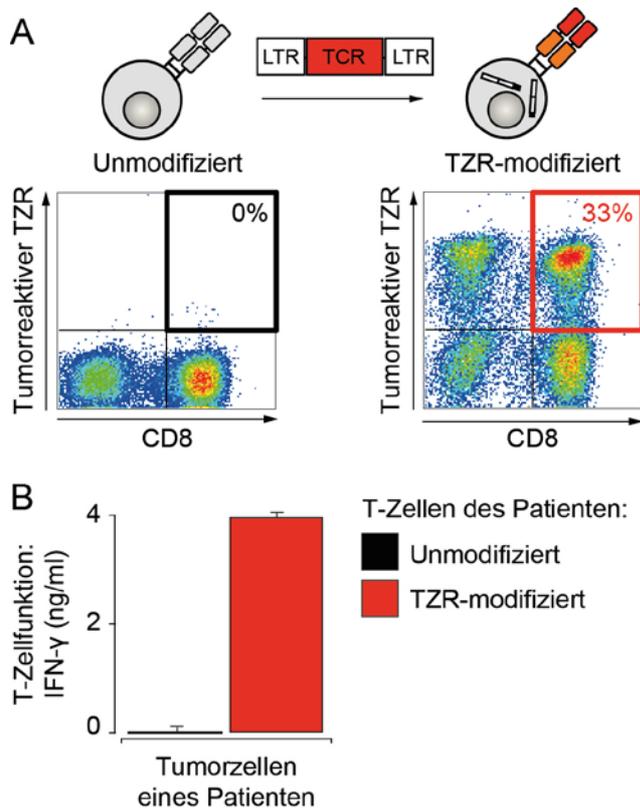


Abb. 2

Herstellung und Charakterisierung von "Designer"-T-Zellen. (A) Analyse der TZR-Expression auf T-Zellen eines Patienten vor (unmodifiziert) und nach (TZR-modifiziert) der genetischen Veränderung mit einem TZR-kodierenden Vektor. Die T-Zellen sind mithilfe spezifischer Antikörper markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert worden: CD8 (x-Achse, Korezeptor zytotoxischer T-Zellen, der zur Bindung an den MHC-I-Komplex notwendig ist), Tumorreaktiver TZR (y-Achse, verleiht der T-Zelle Reaktivität gegen den Tumor). Prozentangaben beziehen sich auf T-Zellen, die sowohl CD8 als auch den tumorreaktiven TZR auf der Oberfläche tragen. (B) Die unmodifizierten und TZR-modifizierten T-Zellen aus (A) wurden mit Krebszellen eines Patienten inkubiert. Die anti-Tumorreaktivität TZR-modifizierter T-Zellen zeigt sich durch Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ .

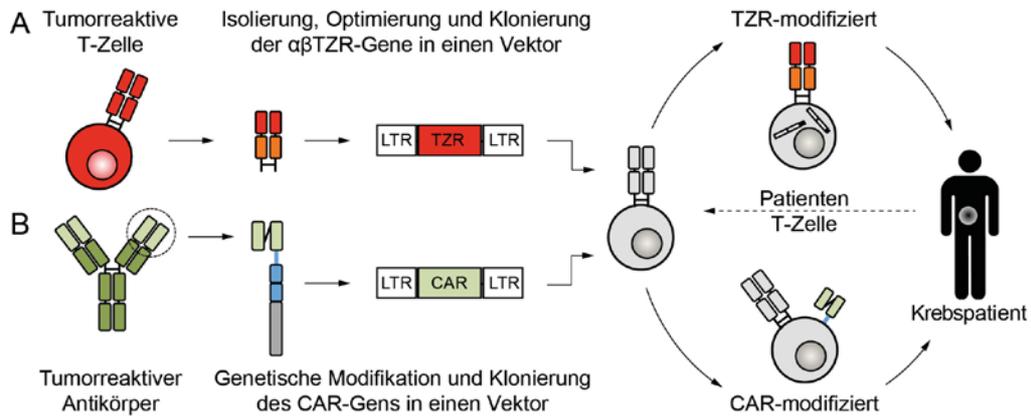


Abb.3

Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der TZR- (A) und CAR-Gentherapie (B). T-Zellen werden einem Krebspatienten entnommen und *ex-vivo* mit Vektoren genetisch so verändert, dass sie in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Die TZR- oder CAR-modifizierten T-Zellen ("Designer"-T-Zellen) werden expandiert und dem Patienten infundiert.