



Immunologische Krebstherapie

Neue Hightech-Ära in der Medizin: Designer T-Zellen gegen Krebs

Abb. 1: Weiße Blutkörperchen (T-Lymphozyten), die mit einem Sensor, einem sogenannten Chimären Antigen-Rezeptor (CAR), ausgestattet werden, sollen Tumorzellen erkennen und abtöten.

Designer T-Zellen, die mit Chimären Antigen-Rezeptoren (CARs) auf Krebserkennung programmiert werden, haben in der Medizin zu einem Durchbruch geführt. Am Universitätsklinikum Würzburg werden neue Zielmoleküle auf Krebszellen erforscht und innovative Technologien entwickelt, um die Effektivität und Sicherheit dieser neuen Therapieform zu erhöhen und für Patienten in Deutschland zugänglich zu machen.

VON MICHAEL HUDECEK UND JULIA WEGNER

Chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs)

Das Immunsystem hat die besondere Fähigkeit, körpereigene und körperfremde Zellen zu unterscheiden. Offenkundig wird diese Fähigkeit bei der Abwehr von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien und Pilzen. Milliarden von weißen Blutkörperchen zirkulieren im Körper, um diese Pathogene, also die Verursacher von Krankheiten, aufzuspüren und zu eliminieren. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die T-Zellen, die zur Familie der weißen Blutkörperchen gehören und wie ein Profiteam bei der Suche und Beseitigung von Krankheitserregern und erkrankten Körperzellen zusammenarbeiten: Killer T-Zellen können durch Ausschüttung von zytotoxischen Botenstoffen als „fremd“ erkannte Zielzellen abtöten. Sie werden begleitet von Helfer T-Zellen, die

ihrerseits durch biochemische Signalstoffe die Vermehrung von Killer T-Zellen so lange anregen, bis alle Krankheitserreger beseitigt sind. Sehr langlebige Gedächtnis T-Zellen sorgen dafür, dass das Immunsystem bei einem erneuten Angriffsversuch desselben Krankheitserregers schnell und höchsteffizient reagiert.

Durch enormen technologischen Fortschritt ist es gelungen, diese immunologischen Prinzipien auch für die Behandlung von Krebs nutzbar zu machen. Die Erkennung von Krebszellen als Fremdkörper ist für das Immunsystem oft schwierig – zu ähnlich sehen bösartige Krebszellen den normalen, gesunden Körperzellen und Geweben. Die moderne Medizin bedient sich deshalb eines Tricks: T-Zellen werden mit einem Sensor, einem sogenannten **Chimären Antigen-Rezeptor (CAR)**, so umprogrammiert, dass sie Krebszellen erkennen können (Abb. 2). CARs sind synthetische Immunrezeptoren. Sie bestehen aus einer extrazellulären Binde-domäne, die wie ein Antikörper ein definiertes Oberflächenmolekül auf Krebszellen erkennt, und einem intrazellulären Signalmodul, das die Killer- und Helferfunktion der T-Zellen aktiviert. CARs vereinen die Vorzüge der Antikörper-vermittelten und T-Zellen-vermittelten Immunität und werden deshalb als „Chimäre“ Antigen-Rezeptoren bezeichnet.

Patienten-eigene CAR T-Zellen: ein „lebendes Medikament“

Die Krebsimmuntherapie mit CAR T-Zellen ist „echte“ personalisierte Medizin: Dem Patienten werden zunächst körpereigene Immunzellen entnommen und Killer- und Helfer T-Zellen durch Zellseparation mit Streptameren oder magnetischen Beads angereichert. Danach wird das Erbmaterial für den CAR durch virale Gentransfervektoren oder Elektroporation in das Genom der T-Zellen eingebracht (Abb. 2). Somit erlangen auch alle nachfolgenden Generationen von Tochter T-Zellen die Fähigkeit, Krebs zu erkennen. T-Zellen, die den CAR Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, werden angereichert, vermehrt und dem Patienten anschließend als Zellprodukt verabreicht. In klinischen Studien kommen derzeit vor allem virale Gentransfervektoren zum Einsatz, der Herstellungsprozess dauert rund 14 Tage. Wir haben in unseren Arbeiten virus-freie Gentransfersysteme entwickelt, die es ermöglichen, den Herstellungsprozess deutlich zu verkürzen. CAR T-Zellen sind ein „lebendes“ Medikament. Sie vermehren sich im Körper des Patienten, bis alle Krebszellen abgeräumt sind, und können den Patienten als CAR Gedächtnis T-Zellen vor einem möglichen Wiederauftreten der Krankheit schützen.

A) CAR Design und Wirkungsmechanismus

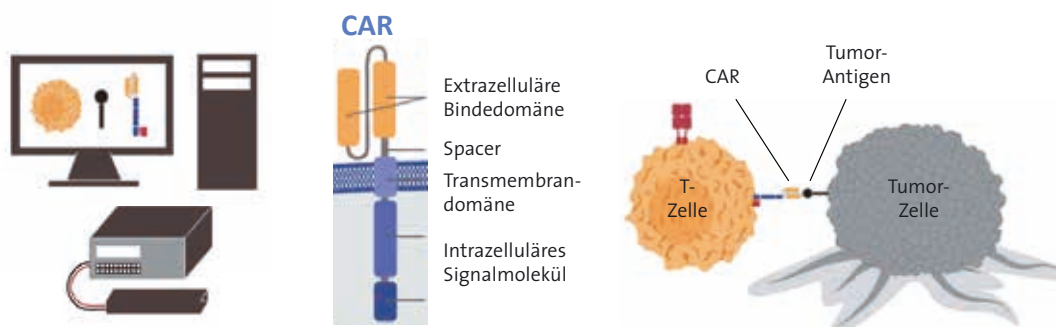
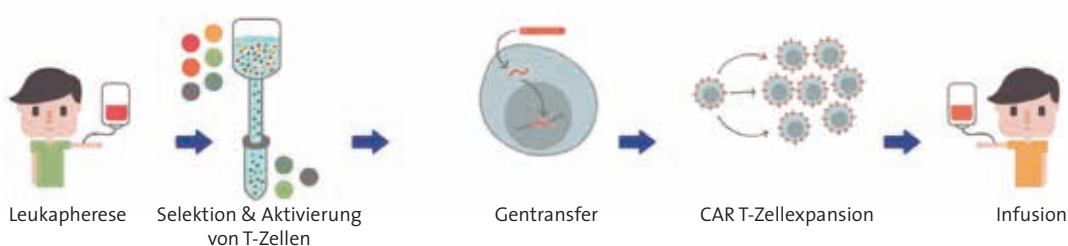


Abb. 2: A) CARs sind synthetische Designer-Moleküle und werden am Computer entwickelt. Die genetische Information für den CAR wird z. B. durch Elektroporation in die T-Zellen eingebracht. Der CAR besteht aus einer extrazellulären Binde-domäne, einem Spacer, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Signalmolekül. Die Interaktion des CARs mit einer Tumorzelle aktiviert Killer- und Helferfunktionen der CAR T-Zellen. B) Um CAR T-Zellen herzustellen, werden dem Patienten zunächst körpereigene Immunzellen entnommen und T-Zellen durch Zellseparation angereichert. Danach wird das genetische Erbmaterial für den CAR durch Gentransfer in die T-Zellen eingebracht. Anschließend werden T-Zellen, die den synthetischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, expandiert und können dem Patienten nun als Zellprodukt verabreicht werden.

B) Therapieschema



Zielmoleküle für CAR T-Zellen

Typ der Erkrankung	Krebsart	Zielmoleküle
Hämatologische Erkrankungen	Leukämie	CD19, CD20, CD22, ROR1, LewisY, CD33, CD123, NKG2D-L
	Lymphknotenkrebs	CD19, CD20, CD22, ROR1, CD30, CD38
	Multiples Myelom	CD38, SLAMF7, CD138, BCMA
Solide Tumore	Mamakarzinom	ROR1, CD44v6, MUC1, VEGFR-2
	Lungenkrebs	ROR1, MUC1, VEGFR-2
	Magen- und Darmkrebs	CD44v6, EphA2, c-MET
	Prostatakarzinom	PSMA, EphA2
	Gehirntumore	ErbB2, EGFRvIII, IL-13Ralphaz

Tab. 1: Zielmoleküle für CAR T-Zellen bei hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren.

Klinischer Wirkungsnachweis bei Leukämie und Lymphknotenkrebs

Diese neue Form der immunologischen Therapie ist prinzipiell bei jedem Krebs einsetzbar. Abhängig davon, um welche Art von Krebs es sich handelt, muss ein geeignetes Zielmolekül identifiziert und der CAR maßgeschneidert werden, um eine optimale Anti-Tumor-Reaktivität zu erreichen. Für viele Krebsarten konnten bereits Zielmoleküle identifiziert werden, die bei allen Patienten oder bestimmten Subgruppen vorhanden sind (Tab. 1). Idealerweise kommt das ausgewählte Zielmolekül nur auf Krebszellen, nicht aber auf normalen Körperzellen vor, um Nebenwirkungen zu vermeiden.

Am weitesten vorangeschritten ist die klinische Entwicklung der CAR T-Zell-Therapie bei Leukämien und Lymphknotenkrebs. Hier kommen CAR T-Zellen zum Einsatz, die ein Zielmolekül mit der wissenschaftlichen Bezeichnung CD19 angreifen. Mehrere Krebstherapiezentren in den USA haben seit 2011 eine Serie höchst eindrucksvoller Ergebnisse aus klinischen Studien präsentiert, in denen es gelungen ist, langanhaltende komplette Remissionen der Leukämie bzw. des Lymphknotenkrebs zu erreichen. Viele der Patienten, die in diesen Studien behandelt wurden, hatten auf konventionelle Therapieverfahren – Chemotherapie und Strahlentherapie – nicht mehr angesprochen und konnten von der CD19-CAR T-Zell-Therapie als Ultima Ratio profitieren (Turtle et al. 2016).

Mit unseren Arbeiten haben wir zu klinischen Studien beigetragen, die aktuell erfolgreich am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle durchgeführt werden. Wir konnten u. a. einen CD19-spezifischen CAR konstruieren,

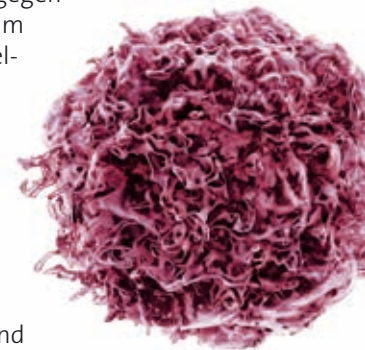
der eine optimale Anti-Tumor-Wirksamkeit zeigt, und nachweisen, dass bestimmte Designmerkmale dieser synthetischen Rezeptoren für ihre Funktion und Wirksamkeit entscheidend sind. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Zusammensetzung des CAR T-Zell-Produktes aus bestimmten Anteilen von Killer und Helfer CAR T-Zellen die Wirksamkeit der Therapie stärker, vor allem aber auch besser steuerbar und vorhersagbar macht. Für den therapeutischen Effekt reicht in der optimalen Mischung bereits eine sehr geringe Dosis an CD19-CAR T-Zellen aus: Nur ca. 200.000 CAR T-Zellen (zu gleichen Teilen

Killer und Helfer CAR T-Zellen) pro Kilogramm Körpergewicht werden den Patienten in Seattle verabreicht – eine verschwindend kleine Zahl im Vergleich zu den vielen Milliarden T-Zellen, die gewöhnlich in unserem Körper zirkulieren (Turtle et al. 2016).

Die klinisch beobachteten Nebenwirkungen der CD19-CAR T-Zelltherapie sind Ausdruck der starken Immunreaktion gegen die Krebszellen. Es kommt zum schnellen Zerfall von Krebszellen (Tumor Lyse Syndrome) und zur Freisetzung von immunologischen Botenstoffen (Cytokine Release Syndrome). Diese Nebenwirkungen können lebensbedrohlich sein, werden aber zunehmend besser und frühzeitig erkannt und anhand internationaler Leitlinien gezielt und erfolgreich behandelt. Eine erwartete Nebenwirkung ist die Depletion normaler B-Zellen, die ebenfalls das CD19-Molekül exprimieren und physiologischerweise für die Antikörper-vermittelte Immunität sorgen. Der Verlust der normalen B-Zellen wird durch die Infusion von Immunglobulinen ausgeglichen, um die Patienten vor Infektionen zu schützen.

Neue Zielmoleküle und innovative Technologien für universelle Anwendbarkeit

Wir verfolgen ein interdisziplinäres, translationales Forschungsprogramm, um CAR T-Zellen als universell einsetzbare Therapieform in der



Krebsmedizin zu etablieren. Eine wichtige Aufgabe ist es dabei, neue Zielmoleküle zu identifizieren und zu validieren, die regelmäßig auf Krebszellen vorkommen und von CARs erkannt werden können. Durch unsere intensive Entwicklungsarbeit verfügen wir aktuell über ein Portfolio an CAR Rezeptoren, mit denen es uns gelingt, mehr als 90 Prozent der hämatologischen Erkrankungen zu adressieren – u. a. auch akute myeloische Leukämien und das Multiple Myelom. Der „Lead“-Kandidat für den Einsatz bei soliden Tumoren ist ein Zielmolekül mit dem wissenschaftlichen Namen ROR1, das bei den häufigsten soliden Tumoren bei Frauen und Männern – Brust- und Lungenkrebs – vorkommt. Es ist uns als weltweit erste Gruppe gelungen, einen ROR1-spezifischen CAR zu konstruieren und dessen Anti-Tumor-Wirksamkeit nachzuweisen (Hudecek et al. 2013). In kürzlich erschienenen Arbeiten konnten wir in vorklinischen Modellen die Sicherheit von ROR1-CAR T-Zellen darstellen. Klinische Studien mit ROR1-CAR T-Zellen sind an unserer Klinik in Vorbereitung.

Ein wichtiger Schwerpunkt unserer derzeitigen Forschungsarbeit ist die Entwicklung neuer Strategien, um die Sicherheit und Steuerbarkeit der CAR T-Zellen zu optimieren. Aktuelle Konzepte bestehen in der Verwendung von Suizidmarkern, mit denen die CAR T-Zellen

im Falle von Toxizität auf Knopfdruck ausgeschaltet werden können und verschwinden. Diese Strategien können bei schwerwiegenden Nebenwirkungen lebensrettend sein. Es gibt aber auch Situationen, in denen es ausreichen kann, die CAR T-Zellen nur vorübergehend auszuschalten und anschließend

wieder zu aktivieren, um den therapeutischen Effekt zu erhalten. Wir haben erstmals ein abgestuftes Verfahren entwickelt, mit dem der behandelnde Arzt und der Patient die T-Zellen nicht nur „aus-“, sondern auch wieder „ein-“schalten können, um die CAR T-Zellen wie mit einer Fernbedienung zu steuern.

Die Methodik des Gentransfers, mit dem das Erbgut für den CAR in die T-Zellen eingebracht wird, ist wissenschaftlich interessant, aber auch ein essentieller Aspekt beim Übergang vom Labor in die klinische Praxis. In den meisten klinischen Studien mit CAR T-Zellen wurden bisher virale Gentransfervektoren eingesetzt, deren Herstellung relativ teuer und deren Einsatz mit hohen regulatorischen Auflagen versehen ist. Wir haben uns deshalb auf die

Entwicklung virus-freier Gentransferverfahren konzentriert, bei denen das Erbgut für den CAR durch ein Enzym mit dem klangvollen Namen „Sleeping Beauty“ in das Genom der T-Zellen integriert wird (Monjezi et al. 2016). Durch die hohe Effizienz, niedrigere Kosten und ein deutlich überlegenes Sicherheitsprofil hat dieses virus-freie Gentransferverfahren das Potential, zum neuen Goldstandard in der Gen- und Zelltherapie zu werden.

CAR T-Zellen als global verfügbares Krebsmedikament?

CAR T-Zellen sind in der Hämatologie und Onkologie derzeit in aller Munde, von wissenschaftlichem Durchbruch und Hightech-Medizin ist die Rede. Der klinische Wirkungsnachweis bei hämatologischen Erkrankungen ist erbracht, steht bei soliden Tumoren aber noch aus. Unsere Arbeitsgruppe befindet sich in engem Austausch mit den deutschen regulatorischen Behörden und hat sich zum Ziel gesetzt, in naher Zukunft klinische Studien mit CAR T-Zellen am Universitätsklinikum Würzburg anbieten zu können. Entsprechend unserem translationalen Forschungsansatz werden dabei neue Zielmoleküle, neue Krebsentitäten und neue CAR Technologien im Fokus stehen.

Entscheidend für die Etablierung von CAR T-Zellen in der klinischen Praxis ist auch das überragende Interesse von Biotech- und pharmazeutischen Unternehmen, die mit ihren Ressourcen in Produktion und Logistik diese Zellprodukte global verfügbar machen können. Die erste Marktzulassung von CD19-CAR T-Zellen für die Behandlung von Leukämie wird in den USA für 2017 erwartet.

DIE AUTOREN

Dr. Michael Hudecek leitet als Arzt und Wissenschaftler seit 2012 die von der Deutschen Krebshilfe e.V. geförderte Max-Eder-Forschungsgruppe „CAR T-cell Engineering“ an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II am Universitätsklinikum Würzburg. Er ist seit 2014 Mitglied des Jungen Kollegs der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, die sein Vorhaben „Engineering von ROR1-CAR modifizierten T-Zellen für die Immuntherapie von ROR1+ Tumoren“ fördert.

Dr. Julia Wegner ist als Wissenschaftsmanagerin in der Forschungsgruppe tätig.

Literatur

M. Hudecek et al., Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells, in: *Clinical Cancer Research*, 2013 Jun 15; 19 (12): 3153–3164.

R. Monjezi et al., Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral *Sleeping Beauty* transposition from minicircle vectors, in: *Leukemia*, 2016 Aug 5; 10.1038/leu.2016.180.

C. Turtle et al., Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells, in: *Science Translational Medicine*, 2016 Sep 7; 8 (355): 355ra116.