

Schlussbericht für das Verbundprojekt

Gentherapie für die selektive Induktion von Apoptose durch TRAIL beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom

Zuwendungsempfänger: 01GU0611 Universität Heidelberg, Prof. Dr. Ingrid Herr (TP1)

Laufzeit: 01.10.2006 bis 31.12.2010

1. Aufgabenstellung und Zusammenfassung

Ziel des Verbundprojektes war die präklinische Etablierung einer Gen-Immuntherapie gegen das Prostatakarzinom. Der gentherapeutische Ansatz unter Verwendung von primären Lymphozyten, die mittels Lentiviren den tumorselektiven Todesliganden TRAIL überexprimierten, wurde von der Arbeitsgruppe I. Herr (TP1) durchgeführt. Die Kopplung der Lymphozyten an Tumorzellen, welche den Tumorstammzellmarker EpCAM überexprimierten wurde mithilfe des bispezifischen Antikörpers EpCAMxCD3 von der Arbeitsgruppe G. Moldenhauer (TP2) durchgeführt. Im letzten Teil des Projekts wurden beide therapeutischen Ansätze miteinander gekoppelt. Die Experimente wurden in sehr enger Zusammenarbeit der beiden Arbeitsgruppe durchgeführt und sind inzwischen publiziert bzw. zur Publikation eingereicht. Aufgrund eines Wechsels der AG I. Herr von der Urologie an die Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg, wurde der Ansatz nicht nur für das Prostatakarzinom, sondern auch für das Pankreaskarzinom etabliert. Dies hat sich angeboten, da das Europäische Pankreaszentrum an der Chirurgischen Universitätsklinik angesiedelt ist und ein großer Bedarf neuer Therapieoptionen für den aggressiven Bauchspeicheldrüsenkrebs besteht. Beide Tumorentitäten exprimieren das Zielgen EpCAM (ESA), das nach Antragstellung als Tumorstammzellmarker bekannt geworden war. Deshalb lag es nahe die Untersuchung der Wirkung der Gen-Immuntherapie auf die Tumorstammzellen als neuen Schwerpunkt mit in das Verbundprojekt aufzunehmen. Die zielgerichtete Eliminierung von Tumorstammzelle erscheint von großer Bedeutung, da nach der Theorie eine Therapie nur dann längerfristig das Tumorstammwachstum hemmen kann, wenn die therapieresistenten Tumorstammzellen angegriffen werden. In Subprojekt 1 des Klinikpartners wurde die Gentherapie erfolgreich etabliert. Hierzu wurden primäre Lymphozyten aus Blut isoliert und mit dem tumorselektiven Todesliganden TRAIL zur Verstärkung der Immunantwort transduziert. In Subprojekt 2 des DKFZ-Partners wurden die Lymphozyten mit dem bispezifischen Antikörper EpCAMxCD3 verknüpft, wodurch die Lymphozyten zielgerichtet hin zu EpCAM-positiven Tumorstammzellen gelenkt und diese effizient eliminiert werden konnten. Die Arbeiten von Subprojekt 2 ist als gemeinsame Publikation der beiden Antragsteller veröffentlicht (Salnikov et al., 2009). Eine zweite Publikation des Subprojekts 1 ist ebenfalls als gemeinsame Publikation der Antragsteller beim Fachjournal GUT (Kallifatidis 2009) veröffentlicht und eine dritte Publikation ist gerade bei "Cell Death and Differentiation" eingereicht. Weitere gemeinsame Publikationen der Antragsteller sind aufgrund der guten Zusammenarbeit im Rahmen des Verbundprojekts entstanden, welche jedoch nicht das Thema des Verbundprojekts behandeln - in diese Manuskripte ist die Expertise mit eingeflossen, welche im Rahmen des Verbundprojekts erworben wurde. Durch die beiden Haupt-Manuskripte ist belegt, dass die Antragsteller wie ursprünglich geplant die Gen-Immuntherapie erfolgreich in präklinischen Untersuchungen etablieren konnten. Es konnte gezeigt werden dass beide Einzeltherapien für sich eine Anti-Tumor Wirkung zeigen, dass jedoch die Kombination einen synergistischen Effekt zeigt. Im

Mausmodell konnten keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet werden. Deshalb könnte sich die Gen-Immuntherapie zur begleitenden Anwendung neben der konventionellen Tumorthherapie beim Patienten eignen.

2. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse

2.1 Klonierung eines Tetrazyklin-induzierbaren lentiviralen Vektors zur Expression von TRAIL

In der Studie geplant war die Überexpression des Todesliganden TRAIL in zytotoxischen T Zellen, um dadurch selektiv Apoptose in Tumorzellen, nicht aber in normalen Zellen induzieren zu können. Um TRAIL effizient in Lymphozyten einzubringen und die Expression an- und abschaltbar zu machen, wurde Tet-regulierter lentiviraler Vektor verwendet. Dieser wurde für das Verbundprojekt modifiziert indem das Luziferasegen des Ursprungsvektors durch ein eGFP-TRAIL Fusionsgen ersetzt wurde. Damit kann das therapeutische Gen TRAIL zusammen mit dem Markergen eGFP exprimiert werden und transduzierte Lymphozyten fluoreszieren grün. Das Konstrukt hat sich in Expressionsstudien als geeignet für die Überexpression von TRAIL in Zielzellen erwiesen.

2.2 Transduktion humaner Lymphozyten mit lentiviralem TRAIL

Die Methode der lentiviralen Transduktion primärer Lymphozyten wurde erfolgreich etabliert. Da die Etablierung anfänglich schwierig war, hat eine Mitarbeiterin die Methodik im Labor von Prof. M. Grez im Georg-Speyer-Haus Frankfurt erlernt. Optimiert wurden die eingesetzte Virenzahl, der Zeitpunkt der Transduktion und die Zytokinzusammensetzung des Zellkulturmediums. Die Transduktionseffizienz konnte dadurch auf 75% gesteigert werden was sehr hoch bei primären Lymphozyten ist und ausreicht für eine erfolgreiche Überexpression von TRAIL in Lymphozyten. Die Wirksamkeit der hergestellten TRAIL-Viren wurde bei etablierten Zelllinien des Pankreas- und Prostakarzinoms in vitro und an 3D Modellen getestet, welche der Partner des SP1 etabliert hat. Zum Einsatz kamen FACS-Analysen, Apoptose-Assays, Antikörper-Arrays und Immunhistochemie.

2.3 Untersuchung der TRAIL-Gentherapie an Tumorxenografts auf der Maus

Um die Wirksamkeit der TRAIL-Lymphozyten auf Xenografttumoren zu testen wurden etablierte Zelllinien des Pankreas- und des Prostatakarzinoms subkutan auf immundefiziente Mäuse transplantiert. Durch Injektion der TRAIL-Lymphozyten wurde das Tumorwachstum reduziert. Durch RT-PCR Analysen der Genexpression in den Xenografttumoren wurde gefunden, dass TRAIL-Lymphozyten im Vergleich zu normalen Lymphozyten eine Vielzahl an Veränderungen in der Expression von pro- und anti-apoptotischen Genen hervorrufen.

2.4 Etablierung von Testmethoden zum Nachweis von Tumorstammzellmarkern

Um die Wirkung der Gen-Immuntherapie gegen Tumorstammzellen zu testen, war es notwendig die entsprechende Methodik zu etablieren. Wir haben daher Methoden zum Nachweis des Selbsterneuerungspotentials (Spheroïd- und Colony-forming Assay), der ALDH1-Aktivität und der Expression von Tumorstammzellmarkern (CD133, EpCAM/ESA, CD24, CD44) in Einfach- und Doppelfärbungen mittels Immunhistochemie und Detektion in der FACS-Analyse oder in der Fluoreszenz-Mikroskopie etabliert. Diese Methoden haben wir zusammen mit dem Nachweis der

Apoptose-Resistenz, der NF- κ B Aktivität, "Stemness"-Proteinen, des Migrationspotentials und des Wachstums auf Mäusen angewendet, um die Wirkung von TRAIL alleine oder im Rahmen der Gen-Immuntherapie zu testen. Die Tests hierfür sind veröffentlicht (Kallifatidis et al, GUT 2009).

2.5 Untersuchung der kombinierten TRAIL-Immuntherapie an Tumorxenografts auf der Maus

Nach erfolgreicher Etablierung der beiden therapeutischen Einzelstrategien konnten wir die Kombinationen zweier Versuche durchgeführt: im ersten wurden Tumorzellen und Gen-Immuntherapie gleichzeitig injiziert. Im zweiten Versuch wurde die Gen-Immuntherapie erst nach Anwachsen der Tumorxenografts verabreicht. Getestet wurde die Gen-Immuntherapie sowohl an Xenografts des Pankreas- und des Prostatakarzinoms. Normale Lymphozyten und TRAIL-Lymphozyten entweder alleine oder in Kombination mit EpCAMxCD3 gleichzeitig mit den Tumorzellen subkutan auf immundefiziente Mäuse transplantiert. Ausgewertet wurde das Tumorwachstum. An Tumorschnitten wurde der therapeutische Effekt der Therapie auf Apoptose, Proliferation und Angiogenese evaluiert. Während die Ko-Transplantation von TRAIL-Lymphozyten alleine das Tumorwachstum verzögerte und Apoptose induzierte, wurde dieser Effekt durch die Verlinkung der TRAIL-Lymphozyten mit dem bispezifischen Antikörper EpCAMxCD3 drastisch verstärkt: das Tumorwachstum von Xenografts konnte durch die Kombinationstherapie komplett aufgehoben werden. Dies führen wir auf die verstärkte Kontaktzeit zwischen Lymphozyten und Tumorzellen zurück, was durch den bispezifischen Antikörper vermittelt wird. Zudem kann TRAIL in Lymphozyten unbeschadet den Tumor erreichen und dort durch die verlängerte Kontaktzeit mit dem Tumor besser wirken, als nach systemischer Applikation von löslichem TRAIL. Von besonderem Interesse ist, dass unser therapeutischer Ansatz auch gegen Tumorstammzellen wirksam ist, die das Markergen EpCAM exprimieren. Von besonderem Interesse ist, dass unsere neuartige therapeutische Strategie auch solche pankreatische Tumorzellen eliminiert, die wir durch kontinuierliche Behandlung mit steigenden Dosen des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin selektioniert haben. Diese Zellen exprimierten eine höhere Zahl von Stammzellmarkern und waren resistent gegen die konventionelle Chemotherapie. Diese Resistenz wurde jedoch durch Behandlung mit TRAIL-Lymphozyten durchbrochen und die Kombination mit EpCAMxCD3 brachte einen noch stärkeren Effekt. Dies haben wir durch in vitro Versuche und Bestimmung der Anwachsrate vorbehandelter Zellen in Mäusen bestimmt. Diese neuen Daten sind momentan bei der Fachzeitschrift "Cell Death and Differentiation" zur Publikation eingereicht. Zusammenfassend beruht die ausgeprägte Anti-Tumorwirkung der Gen-Immuntherapie auf drei Hauptmechanismen, nämlich der Induktion von Apoptose, der Sekretion von Effektorzytokinen sowie der Infiltration von Empfänger-Makrophagen. Funktionell führt dies neben der direkten Tumorzelllyse zur Auslösung einer inflammatorischen Immunreaktion und zu einer Reduktion der Tumorangiogenese. Aufgrund ihrer Wirksamkeit und dem Fehlen augenfälliger toxischer Nebenwirkungen erachten wir die erarbeitete Gen-Immuntherapie, möglicherweise begleitend zur Standardbehandlung, als besonders vielversprechend, um EpCAM-exprimierende Karzinome effektiv und nachhaltig zu eliminieren.

3. Eigene Veröffentlichungen mit Bezug zum Projekt

Veröffentlichungen mit direktem Bezug zu dem vom BMBF-geförderten Projekt sind fett gedruckt, weitere Veröffentlichungen, zu denen die im Rahmen des BMBF-Projekts erarbeitete Expertise beigetragen hat sind normal gedruckt.

1. Beckermann, B.M., Kallifatidis, G., Groth, A., Frommhold, D., Apel, A., Mattern, J., Salnikov, A.V., **Moldenhauer, G.**, Wagner, W., Diehlmann, A., Saffrich, R., Schubert, M., Ho, A.D., Giese, N., Büchler, M.W., Friess, H., Büchler, P., **Herr, I.** (2008) VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, 99(4): 622-631.
2. **Salnikov, A.V., Groth, A., Apel, A., Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G.** (2009) Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma. *J Cell Mol Med*, 13(9B): 4023-4033.
3. Salnikov, A.V., Kusumawidjaja, G., Rausch, V., Bruns, H., Gross, W., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Gebhard, M.M., **Moldenhauer, G.**, Büchler, M.W., Schemmer, P., **Herr, I.** (2009) Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastases is not sufficient as single prognostic parameter. *Cancer Lett*, 275(2): 185-193.
4. **Kallifatidis, G., Rausch, V., Baumann, B., Apel, A., Beckermann, B.M., Groth, A., Mattern, J., Li, Z., Kolb, A., Moldenhauer, G., Altevoigt, P., Wirth, T., Werner, J., Schemmer, P., Büchler, M.W., Salnikov, A.V., Herr, I.** (2009) Sulforaphane targets pancreatic tumor-initiating cells by NF- κ B-induced anti-apoptotic signaling. *GUT*, 58(7): 949-63.
5. Kallifatidis, G., Labsch, S., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., **Moldenhauer, G.**, Büchler, M.W., Salnikov, A.V., **Herr, I.** (2010) Sulforaphane potentiates drug-mediated cytotoxicity towards cancer stem-like cells of pancreas and other tumor entities. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.
6. Zhou, W., Kallifatidis, G., Baumann, B., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., Giese, N., **Moldenhauer, G.**, Wirth, T., Büchler, M.W., Salnikov, A.V., **Herr, I.** (2010) Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *Int J Oncol*, 37(3): 551-561.
7. Salnikov, A.V., Gladkich, J., **Moldenhauer, G.**, Volm, M., Mattern, J., **Herr, I.** (2010) CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 126(4): 950-958.
8. Groth, A.*, Salnikov, A.V.*, Schlesinger, S., Gladkich, J., Kallifatidis, G., Salnikova, O., Ryschich, E., Giese, T., Momburg, F., Büchler, M.W., **Moldenhauer, G., Herr, I.** (2010) New gene-immunotherapy combining TRAIL-lymphocytes and EpCAMxCD3 bispecific antibody for targeting of advanced tumors. *equal contribution. *Zur Veröffentlichung eingereicht bei Cell Death & Differentiation*.

Außerdem wurden Ergebnisse aus dem Projekt auf 11 nationalen und internationalen Konferenzen vorgestellt:

1. Salnikov, A. Groth, A. Apel, G. Kallifatidis, A. Kamidjanov, E. Ryschich, B. Baumann, Thomas Wirth, M. W. Büchler, G. Moldenhauer, I. Herr. Gene-Immunotherapy for selective induction of apoptosis in advanced prostate carcinoma and pancreatic cancer. The 2nd International Conference on Cancer Vaccines/Adjuvants/Delivery for the Next Decade CVADD, Oct. 10-12, 2007, DKFZ, Heidelberg, Germany.
2. Salnikov, A.V., Groth, A., Apel, A., Kallifatidis, G., Khamidjanov, A., Beckermann, B.M., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G. Bispecific EpCAMxCD3 antibody eradicates tumors *in vivo* and potently stimulates lymphocytes in 3D tumor reconstruct system *in vitro*. The Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Vienna, Austria, Sept. 3-6, 2008.

3. Salnikov, A.V., Groth, A., Apel, A., Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G. Bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic adenocarcinoma by prolonged contacts between lymphocytes and tumor cells. 2nd International Symposium on EpCAM and Cancer Stem Cell Markers, Tutzing, Munich, Germany, Oct. 7-9, 2008.
4. Kallifatidis, G., Salnikov, A.V., Kusumawidjaja, G., Rausch, V., Baumann, B., Apel, A., Beckermann, B.M., Groth, A., Mattern, J., Li, Z., Kolb, A., Altevoigt, P., Wirth, T., Werner, J., Bruns, H., Gross, W., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Gebhard, M.M., Moldenhauer, G., Büchler, M.W., Schemmer, P., Herr, I. Profiling and targeting of cancer stem cells. 2nd International NCI-DKFZ Symposium on Stem Cells and Cancer and 5th International Heinrich F.C. Behr-Symposium, DKFZ, Heidelberg, Germany, Oct. 26-28, 2008.
5. Groth, A., Salnikov, A.V., Ryschich, E., Herr, I., Moldenhauer, G. Gene therapy for selective induction of apoptosis by TRAIL in advanced prostate and pancreatic cancer. 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, Germany, March 8-21, 2009.
6. Salnikov, A.V., Groth, A., Apel, A., Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G. Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma. Gordon Research Conference: "Stem Cells & Cancer", Les Diablerets, Switzerland, Sept. 13-18, 2009.
7. Groth, A., Salnikov, A.V., Schlesinger, S., Gladkich, J., Kallifatidis, G., Salnikova, O., Ryschich, E., Giese, T., Momburg, F., Büchler, M.W., Moldenhauer, G., Herr, I. Enhanced gene therapy with TRAIL by bispecific antibody immunotherapy in advanced pancreatic cancer. 30. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub, Heidelberg, Germany, Nov. 2009.
8. Salnikov, A.V., Groth, A., Schlesinger, S., Gladkich, J., Büchler, M.W., Moldenhauer, G., Herr, I. Targeting of pancreatic carcinoma and CSCs. China Biomedical Innovations Conference 2009 "*Anti-infection, anti-cancer and stem cell biology innovation and collaboration*", Shanghai, China, Nov. 7-8, 2009.
9. Groth, A., Salnikov, A.V., Moldenhauer, G., Herr, I. Enhanced inflammation-associated cytotoxicity upon targeting of TRAIL-lymphocytes by bispecific antibody EpCAMxCD3 to the cancer stem cell marker EpCAM. 4th General Meeting of Alumni DKFZ and Alumni Heidelberg Life-Science Lab, Heidelberg, Germany, June 18-19, 2010.
10. Salnikov, A.V., Groth, A., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G. Overexpression of TRAIL in lymphocytes enhances bispecific EpCAMxCD3 antibody immunotherapy against pancreatic tumor initiating cells. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
11. Salnikov, A.V., Groth, A., Ryschich, E., Büchler, M.W., Herr, I., Moldenhauer, G. Overexpression of TRAIL in lymphocytes enhances therapeutic efficacy of bispecific EpCAMxCD3 antibody against pancreatic cancer stem cells. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki, Greece, Oct. 7-9, 2010.