

Projektbericht

Projekttitle: Einfluss von Interferon-beta und Checkpoint-Inhibition auf die zytotoxische Wirkung von Natural Killer Zellen beim Nasopharynxkarzinom

Antragssteller: Dr. rer. medic. Anna Makowska, Prof. Dr. med. Udo Kontny, Sektion Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Klinik- für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Aachen

Projektförderung: 1.11.2019 bis 31.10.2021

Hintergrund:

Das Nasopharynxkarzinom (NPC) ist ein maligner Tumor, der von den Epithelien des Nasenrachenraums ausgeht und unbehandelt zum Tod führt. Die besten Behandlungsergebnisse werden in Protokollen erreicht, bei denen sich eine 6-monatige Erhaltungstherapie mit Interferon-beta (IFN β) an die Standardtherapie aus neoadjuvanter Chemotherapie und Radiochemotherapie anschließt. Während der klinische Nutzen von IFN β hinreichend bekannt ist, gab es bis vor kurzem keine Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von IFN β beim NPC. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass IFN β *in vitro* über die Expression des Todesliganden TRAIL den programmierten Zelltod (Apoptose) in NPC-Zellen auslöst, indirekt über die Expression des Todesliganden TRAIL auf Natural Killer (NK)-Zellen zur Elimination von NPC-Zellen führt, und dieser Prozess durch Vorbehandlung von NK-Zellen durch Checkpoint-Inhibierung verstärkt werden kann. Untersuchungen, ob diese Effekte auch *in vivo* erzielt werden können, gab es bisher nicht.

Ziel dieses Projektes war es daher, zum einen den direkten Einfluss von IFN β auf NPC-Zellen im Xenograft-Mausmodell zu untersuchen und zum anderen den Beitrag von IFN β bei der Erkennung und Elimination von NPC-Zellen durch Effektoren des Immunsystems wie Natural Killer (NK)-Zellen zu analysieren.

Ergebnisse:

1. Einfluß von IFN β auf das Wachstum von NPC-Tumoren im Maus-Xenograft-Modell

Im ersten Teil des Projektes wurde der direkte Effekt von IFN β auf das Wachstum und den Zelltod von NPC-Tumoren *in vivo* untersucht. Für das Verständnis der Wirkung von IFN β beim Nasopharynxkarzinom ist es wichtig, dass die Untersuchungsmodalitäten im Maus-Modell möglichst den klinischen Gegebenheiten beim Patienten entsprechen. Aus diesem Grund erhielten die Mäuse eine subkutane Gabe von IFN β (Rebif) in einer Dosis von 2000 IU pro Maus 3x pro Woche. Diese IFN β Dosis entspricht gewichtsbezogen derjenigen, die bei Patienten mit einem NPC verwendet wird. Die Häufigkeit der IFN β -

Injektionen ergibt sich aus der kurzen Bioverfügbarkeit des IFN β . Die maximale Plasmakonzentration wird 8 bis 24 Stunden nach Injektion erreicht. 48 Stunden nach der Injektion ist der Plasmaspiegel auf das Niveau vor Injektion gesunken. Aus diesem Grund ist eine 3x wöchentliche Injektion von IFN β bei den Versuchstieren wie bei den Patienten vonnöten. Eine Alternative zu IFN β ist PEG-Interferon-beta (PEG-IFN β), welches besser löslich und zugleich stabiler als IFN β ist. Gebunden mit Polyethylenglykol (PEG) ist die Wirksubstanz vor Abbauprozessen geschützt, sodass sie länger im Körper verfügbar ist und ihre Wirkung über einen längeren Zeitraum entfalten kann. Bei Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom wurde PEG-IFN β bisher nicht untersucht. Hingegen liegen Informationen bei der multiplen Sklerose vor. Die in der Fachinformation empfohlene Dosierung von PEG-IFN β beträgt 63 μg / Person (= 6×10^6 IU), alle 2 Wochen als subkutane Injektion und wird äquivalent zur 3x wöchentlichen subkutanen Injektion von 6×10^6 IU IFN β betrachtet. In unserer Studie haben wir beide Arzneimittel miteinander verglichen. Das mittlere Tumorstadium zeigt einen deutlichen Unterschied im Tumorstadium zwischen der Kontrollgruppe (ohne Behandlung) und den IFN β (Rebif) und PEG-IFN β Gruppen. Die beide IFN β -Arten zeigten eine sehr ähnliche Hemmung des Tumorstadium (Abbildung 1).

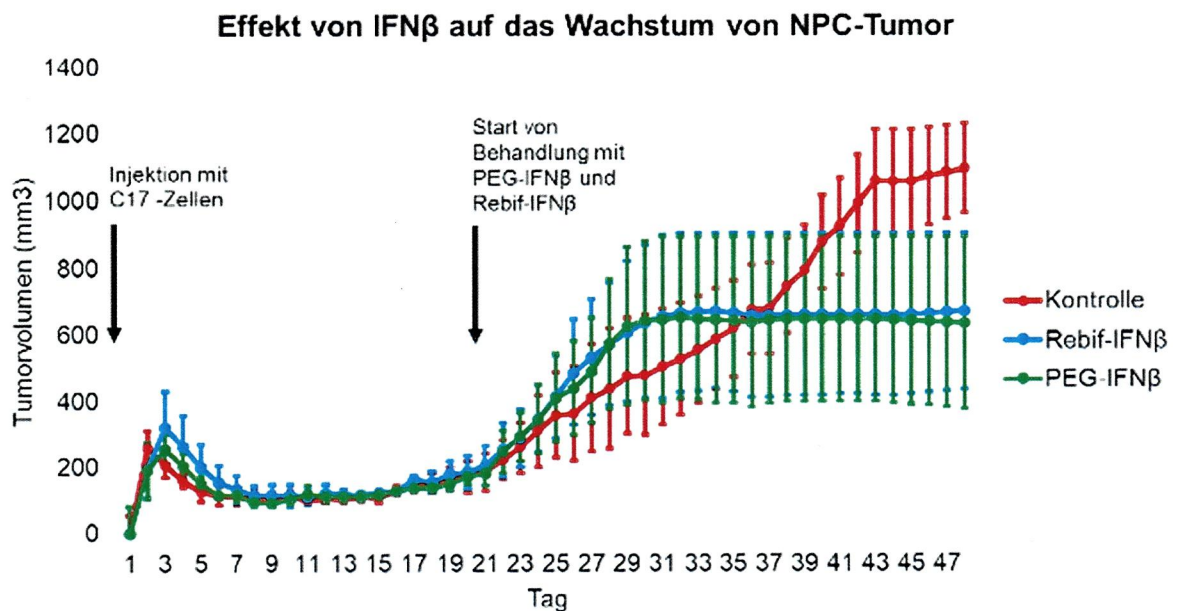


Abbildung 1 – Effekt von IFN β auf das Wachstum von NPC-Tumoren. Die Mäuse erhalten eine subkutane Gabe von IFN β (Rebif-IFN β) in einer Dosis von 2000 IU pro Maus 3x pro Woche oder PEG-Interferon-beta (PEG-IFN β) von 2000 IU pro Maus 1x alle 2 Wochen. Jede Gruppe zeigt den Mittelwert von 14 Tiere (Mittelwert \pm Standardfehler)

2. Einfluß des adoptiven Transfers von NK-Zellen auf das Wachstum von NPC-Tumoren *in vivo*.

Im zweiten Teil unserer Studie, wurde mittels der dargelegten Experimente der Effekt von NK-Zellen auf das Wachstum von NPC-Tumoren im Maus-Xenograft-Modell untersucht. Das Nasopharynxkarzinom ist durch eine lymphozytäre Infiltration charakterisiert. Ein hoher Anteil an NK-Zellen im Tumorinfiltrat ist mit einem besseren Gesamt- und progressionsfreien Überleben der NPC-Patienten assoziiert. NK-Zellen sind in der Lage, abnormale Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen zu erkennen und abzutöten. Der adoptive Transfer von NK-Zellen beim Menschen wurde in mehreren klinischen Studien getestet und u.a. eine klinische Aktivität bei Patienten mit Ovarialkarzinom und verschiedenen Leukämie-Typen beschrieben. Die Xenograft-Modelle unterschieden sich durch NK-Zellzahl und Applikationsweg voneinander. In den meisten Xenograft-Modellen, wurden NK-Zellen direkt intratumoral injiziert. Für den direkten intratumoralen NK-Transfer wird im Vergleich zur intravenösen Injektion eine viel geringere NK-Zellzahl benötigt. Da für Patienten eine intravenöse Applikation deutlich weniger invasiv als eine intratumorale Applikation ist, wurden in den hier dargelegten Experimente den Mäusen zur Ermittlung einer optimalen NK-Zellzahl 3 verschiedene NK-Zellmengen (10^6 , 10^7 , 10^8) 2 mal im Abstand von 14 Tagen intravenös injiziert. In dieser Studie zeigen wir, dass im Vergleich zu der Kontrollgruppe (ohne Behandlung), der NK-Zelltransfer zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Tumorwachstums führt (Abbildung 2).

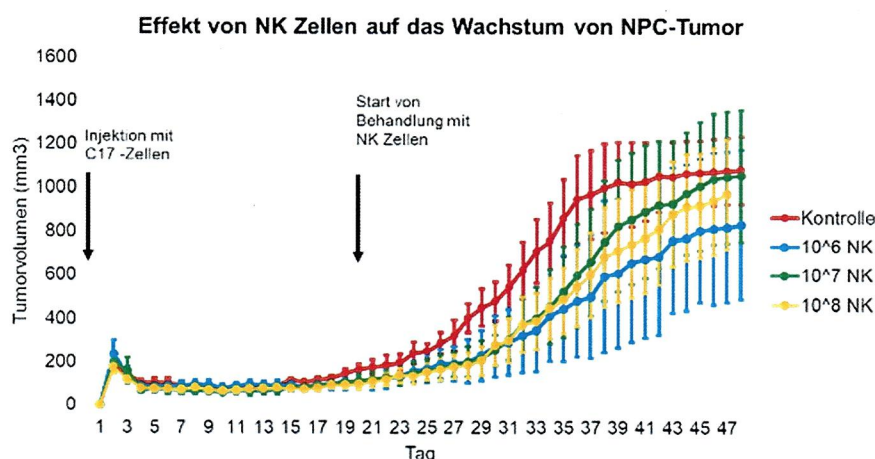


Abbildung 2 - Effekt von NK Zellen auf das Wachstum von NPC-Tumoren. Die Mäuse erhielten eine i.v. Gabe von NK Zellen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (10^6 , 10^7 , 10^8) 1x alle 2 Wochen. Jede Gruppe zeigt den Mittelwert und Standardfehler von 14 Tieren.

3. Untersuchung der Rolle des Immuncheckpoints PD-L1/PD-1 beim Wachstum von NPC-Tumoren *in vitro* und *in vivo*.

Mit der Entwicklung immunonkologischer Behandlungsansätze wurde vor wenigen Jahren ein Paradigmenwechsel in der Tumorthherapie eingeläutet. Er

basiert auf der Entdeckung von Checkpoint-Molekülen, die für die Regulation der Immunantwort essenziell sind. Diese Moleküle verhindern physiologischerweise überschießende Immunreaktionen und die Entwicklung einer Autoimmunität, werden aber auch von Tumorzellen genutzt, um sich einer Immunabwehr zu entziehen (Immune escape). Wichtige Checkpoint-Moleküle sind der auf NK-Zellen exprimierte Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) - Rezeptor und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 auf der Tumorzelloberfläche. Bei Interaktion zwischen dem Rezeptor und PD-L1 und damit direktem Kontakt zwischen NK-Zelle und Tumorzelle wird ein inhibitorisches Signal übermittelt und die Effektorfunktion der NK-Zelle herunterreguliert – die Tumorzelle überlebt. Mittlerweile hat sich das Konzept der Immun-Checkpoint-Blockade durch gegen PD-1 gerichtete monoklonale Antikörper wie z.B. Nivolumab bei mehreren Tumorentitäten als effektiv erwiesen. *In vitro* konnten wir zeigen, dass IFN β die Expressionsstärke von PD-L1 auf NPC-Zelllinien und die Expression von PD-1 auf NK-Zellen signifikant erhöht (Abbildung 3). Ebenso konnten wir zeigen, dass IFN β die Expression von PD-L1 auf NPC-Tumoren *in vivo* erhöht (Abbildung 4). Ziel weiterer Experimente wird es sein, zu untersuchen, ob der Einsatz eines PD-1 Checkpoint-Inhibitors, das Wachstum von NPC-Tumoren *in vivo* hemmt.

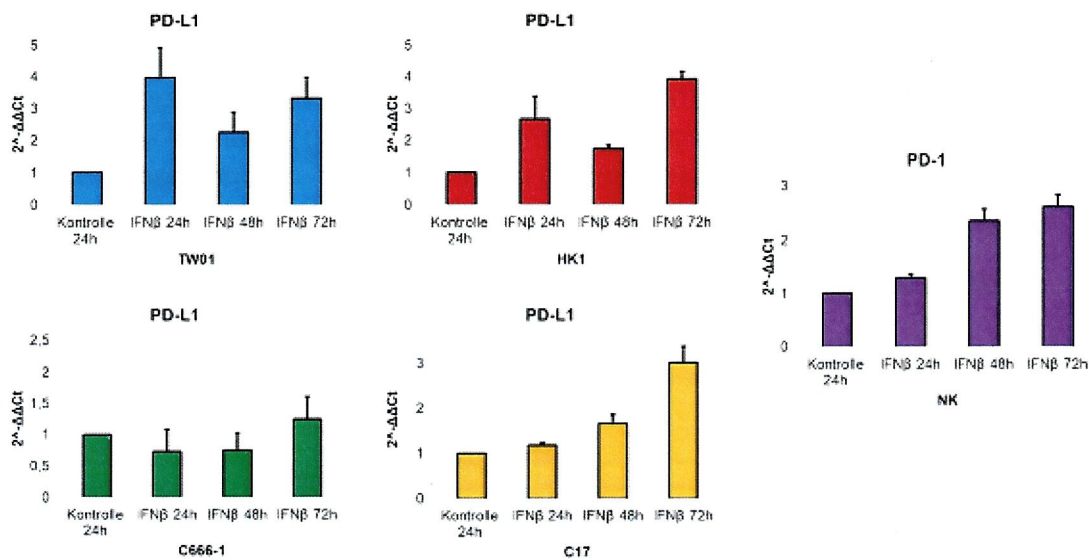


Abbildung 3 – PD-L1 Expression in 4 NPC Zelllinien und PD-1 Expression in NK Zellen nach 1000 U/ml IFN β Behandlung. Die Bilder zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängige Versuche.

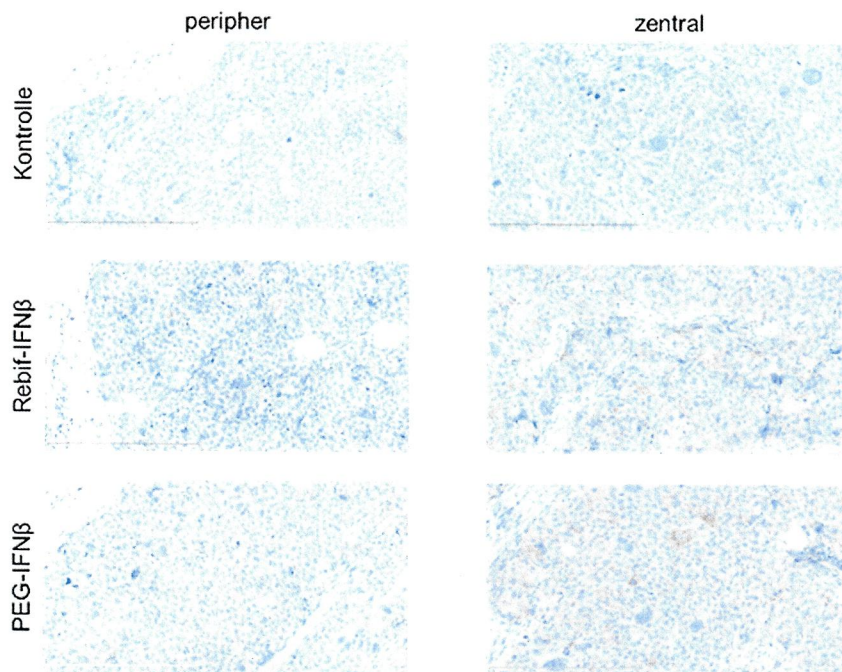


Abbildung 4 - Immunhistochemische Färbung von PD-L1. Die Mäuse erhalten eine subkutane Gabe von IFNβ (Rebif-IFNβ) in einer Dosis von 2000 IU pro Maus 3x pro Woche oder Peg-Interferon-beta (PEG-IFNβ) von 2000 IU pro Maus alle 2 Wochen.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen vielversprechende Ansätze für eine Weiterentwicklung der Therapie von Patienten mit einem NPC. So legt das Ergebnis eines nahezu gleichartigen Effektes von konventionellem IFNβ und PEG-IFNβ im Maus-Xenograft-Modell auf die Hemmung des Wachstums von NPC-Tumoren, die klinische Prüfung von PEG-IFNβ nahe, was für Patienten den Vorteil hätte, statt 3 mal wöchentlich nur alle 2 Wochen eine Injektion mit IFNβ zu erhalten. Des Weiteren zeigen unsere Experimente, dass der adoptive Transfer von NK-Zellen über die Vene bei Mäusen toleriert wird und zu einer Verminderung des Tumorwachstums führt. Da ein solcher NK-Zell-Transfer bereits bei anderen Tumorarten erfolgreich durchgeführt wurde, könnte ein solcher auch bei Patienten mit einem therapierefraktären NPC in einer klinischen Studie überprüft werden. Auf Grund dessen, dass IFNβ die Expression des inhibitorischen Liganden PD-L1 auf NPC-Zellen und des entsprechenden Rezeptors PD-1 auf NK-Zellen induziert, und dadurch die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber NPC-Zellen mindert, ist eine Kombination von Nivolumab mit IFNβ in der Therapie von Patienten mit einem NPC aufgrund dieser Daten vorstellbar.

Aachen, den 27.03.2023

Dr. rer. medic. Anna Makowska

Prof. Dr. Udo Kontny