

Project titel: alloreactieve NK cel therapie voor borst kanker.

Ons project volgt op onze reproduceerbare bevindingen dat muizen borst kanker kan worden genezen door donor “natural killer” (NK) cel therapie. Genezing is o.a. afhankelijk van het aantal getransplanteerde NK cellen. We hebben ook genezing kunnen bewerkstelligen met menselijke NK cellen in muizen die een menselijke borst kanker ingespoten hadden gekregen.

Het is onze hypothese dat patiënten met borstkanker ook zijn te genezen met hoge dosis NK cellen. Om dit bij patiënten te kunnen testen zijn grote aantallen donor NK cellen nodig. Begin 2012 was ons geen methode bekend die al zover was uitgewerkt dat we direct de waarde van NK cel therapie bij patiënten konden gaan testen. We zochten naar een methode om voldoende van deze NK cellen te kweken. Op kleine schaal lukte het ons om NK cellen zich goed te laten vermeerderen, maar we hadden dit nog niet op zulk een schaal gedaan die het aantal benodigde NK cellen zou opleveren. Bovendien moesten we nog naar wegen zoeken om ongewenste witte bloed cellen (de zogenaamde T lymfocyten) “kwijt te raken” tijdens de kweek, omdat deze anders schade zouden berokkenen aan patiënten.

Het lag in onze bedoeling om met de subsidie van A Sister’s Hope in 2012 te werken aan het opschalen van de NK cel kweken en aan het kwijt raken van de T lymfocyten.

In het vroege voorjaar van 2012 kwamen we bij toeval in contact met een Berlijns bedrijf, Zellwerk GmbH, dat NK cellen bleek te kweken. Ze hadden daartoe een bioreactor ontwikkeld, waarmee uit nog geen 100cc bloed ruim voldoende NK cellen kunnen worden gekweekt. Het lukt hen zelfs om de gekweekte NK cellen bij herhaling in nieuwe kweken te laten vermenigvuldigen.

Einde zomer 2012 is de samenwerking eerst echt goed van de grond gekomen. In eerste instantie bleek echter dat de levensvatbaarheid van de 3-4 weken lang gekweekte NK cellen te wensen overliet. Na enige aanpassingen in de kweekprocedure lukte het om de levensvatbaarheid tot >90% te doen stijgen.

Gelukkigerwijs bevat het NK cel product van Zellwerk geen T lymfocyten, omdat die voor start van de kweek uit het afgenomen bloed worden verwijderd.

Na het verbeteren van de levensvatbaarheid van de gekweekte NK cellen hebben we tot nu toe enkele gekweekte NK cel producten kunnen testen op hun cel dodende capaciteit. Hiertoe gebruiken we verschillende tumor cellijnen, afkomstig van patiënten met leukemie of borstkanker, die we dan samen brengen met de NK cellen. Vervolgens meten we na enige tijd welk percentage van de tumor cellen door de NK cellen is gedood, zijnde een maat voor de effectiviteit van de NK cellen. Zoals in figuur 1 is te zien, worden de leukemie cellen K562 beter gedood dan de borstkanker cellijn MCF7. Dit verschil komt doordat NK cellen in elk individu verschillend van samenstelling zijn. In principe kunnen alle NK cellen K562 doden, maar slechts een deel van de NK celen van gezonde donoren kunnen dat met MCF7. Dit is niet een eigenschap van de NK cellen, maar van de tumorcellijn MCF7 zelf. Er is geen verschil tussen de effectiviteit van gekweekte NK celen en vers bij donoren afgenomen NK cellen.

NK cel alloreactiviteit vraagt dat bepaalde groepen van NK cellen reageren op cellen van andere individuen. Dit komt doordat de verschillende NK cellen verschillende eiwitten op de cel hebben (“remmende KIRs”) die na binding van eiwitten op tumor cellen wel of niet remming van de NK cel veroorzaken. Wanneer NK cellen van een bepaalde donor op grond van specifieke kenmerken geen remming ondervindt, zullen deze worden geactiveerd. Dat is

zichtbaar te maken met de de test zoals beschreven in figuur 2. Daarmee konden we vast stellen dat gekweekte NK cellen ook de alloreactieve NK cel groepen bevatten, wat van groot belang is voor het kunnen welslagen van donor NK cel therapie bij patiënten.

Concluderend kunnen we stellen dat wij dankzij de subsidie van A Sister's Hope een stap dichterbij de toepassing van donor NK cel therapie bij patiënten met uitgezaaide borstkanker zijn gekomen.

Volgende stappen zijn in deze volgorde:

1. het opzetten van een donor bank, waardoor we in staat zijn voor elke patiënte een geschikte donor te vinden, gebaseerd op de aanwezigheid van alloreactieve NK cellen
2. het testen van gekweekte NK cellen in muizen met menselijke borstkanker
3. het starten van studies bij patiënten met uitgezaaide borstkanker

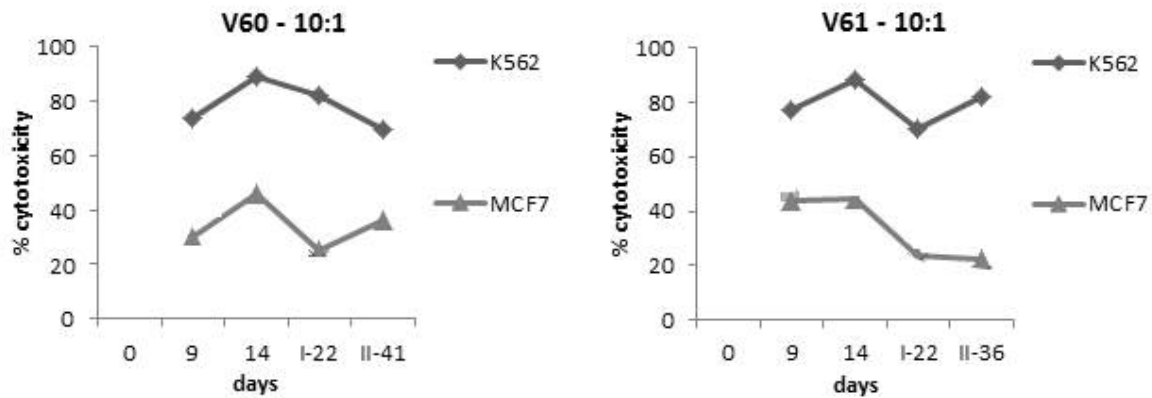
Maastricht, 26 December 2012

Michel van Gelder

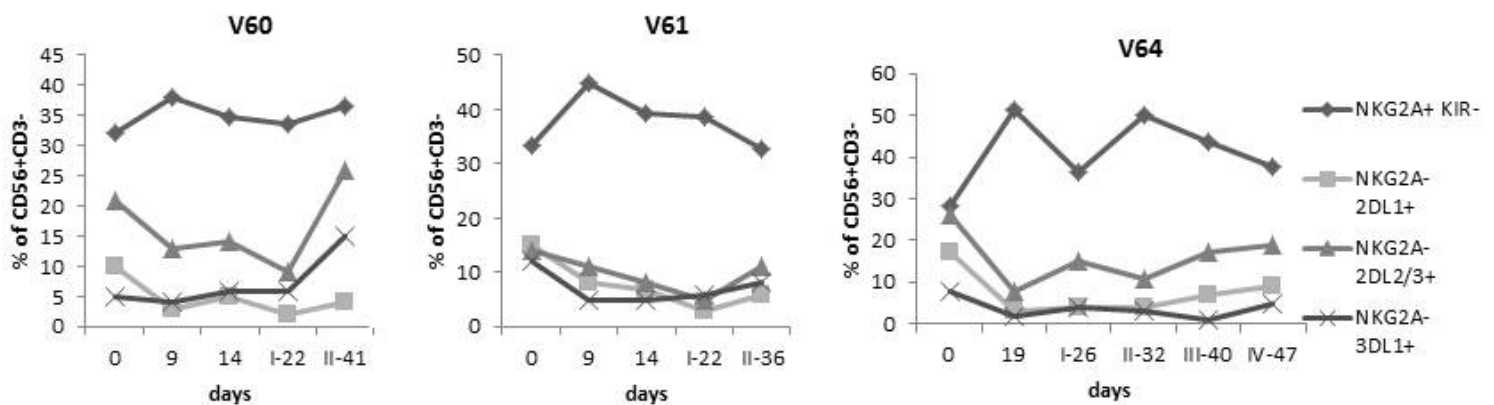


A SISTER'S HOPE





Figuur 1. Cel dodende capaciteit van gekweekte NK cellen van 2 donoren op verschillende tijdstippen tijdens de kweek. Gekweekte NK cellen van verschillende tijdstippen (zoals aangegeven op de x-as, I en II betekenen 2^e en 3^e procedure respectievelijk) werden samen gebracht met de leukemie cellijn K562 of de borstkanker cellijn MCF7 (10 NK cellen op 1 tumor cel). Celdood van fluorescerend gelabelde tumor cellen werd gemeten na overnacht incubatie. **Conclusie: de kill capaciteit van gekweekte NK cellen tegen de twee tumor cellijnen blijft binnen de normaalwaarden voor normale verse NK cellen.**



Figuur 2. Remmende KIR expressie van gekweekte NK cellen van 3 verschillende donoren po verschillende tijdstippen tijdens de kweek. Gekweekte NK cellen op verschillende tijdstippen (zoals aangegeven op de x-as, I, II, III en IV betekenen 2^e, 3^e, 4^e en 5^e procedure respectievelijk) werden geanalyseerd voor remmende KIR expressie. NKG2A is de KIR voor een eiwit dat gewoonlijk op elke cel aanwezig is en dat daardoor niet de alloreactieve subset van NK celen vertegenwoordigt. Anderzijds kunnen NKG2A negatieve NK cellen (aangegeven met NKG2A-) ofwel 2DL1, 2DL2/3 of 3DL1 expresseren; deze representeren de alloreactieve NK cellen. **Conclusie: de percentages van de verschillende alloreactieve NK cel subsets blijft binnen de normale intra-individuele grenzen gedurende de NK cel kweken.**