



V.ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ

27-29 NİSAN 2018 – MALATYA

Hematolojik/Solid Kanser Türlerine Karşı Doğal Öldürücü NK92 Hücrelerinin Sito-Toksik Etkinliği ve Transgenik Anti- CD19 CAR-NK92 Üretimi

Yazarlar : Dr. Cihan Taştan - Dr. Derya Dilek Kançağı - Araştırma Görevlisi Bulut Yurtsever - Araştırma Görevlisi Merve Kongur - Araştırma Görevlisi Muhammet Yılcı - Araştırma Görevlisi Gözde Sır - Araştırma Görevlisi Rengim Vural - Prof. Ercüment Ovalı

Kurum : Acıbadem Labcell

GİRİŞ - AMAÇ

Doğal Öldürücü (Naturel killer, NK) hücreler, malignant hücreleri öldürebilme özelliğinden ötürü hücrel immünoterapi için oldukça cazip hale gelmiştir. Çalışmalar allojenik NK hücre hatlarının in vivo sito-toksik fonksiyonlarını gerçekleştirebildiğini göstermiştir. GMP standartlarında kültüre edilebilir ve yüksek sayılara ulaşılabilirdiğinden immunoterapide birçok hasta için devamlı kaynak olarak kullanılabilmektedir (Klingemann, Frontiers in Immunology, 2016). Hâlihazırda, NK92 veya kimerik antijen reseptörü kodlayan transgenik CAR-NK92 hücreleri, anti-tümör aktivitesi için kanser hastalarında klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (NCT00900809, NCT03383978, NCT02465957, NCT02944162, NCT00990717). Bu nedenle NK-92 aktif sito-toksik hücre hattı, satışa hazır ve standart immünoterapi ajanı olarak görülmektedir (Oelsner, Cytotherapy, 2017). Bu çalışmada NK-92 hücrelerinin hematolojik ve solid kanser türlerine karşı sito-toksik etkinliğinin değerlendirilmesi ve CD19 pozitif kanser türlerini tanıyabilecek transgenik CAR-NK92 hücreler üretilmesi amaçlanmıştır.

METOD

NK92 (CRL-2407) efektör hücreleri, RAJI (CCL-86), Daudi (CCL-213), K562 (CCL-243), A549 (CCL-185) ve DMS-114 (CRL-2066) hedef hücre hatları, ATCC'den tedarik edildi ve özel besi yerlerinde kültüre edildi. NK92 efektör hücrelerinin sito-toksikite etkinliği, hedef hücreler (RAJI, Daudi, K562, A549 veya DMS-114) ile farklı dozlardaki (Efektör:Hedef; 1:1, 5:1, 10:1) ko-kültürleri yapılarak, üretici firmanın talimatlarına göre, Europium testi ile (ELISA'da) değerlendirilmiştir. Ayrıca, NK92 hücre aktivasyonu (24 saat sonra) CD107a ekspresyon artışı (akım sitometri) ile belirlenmiştir. CD19 spesifik CAR geni, anti-CD19 scFv h(CD28-CD3ζ)-EGFRt, Creative Biolabs'a sentezlettilererek lentivirüs vektörüne klonlandı. CAR konstraktı, Sanger dizilemesiyle teyit edildi. CAR kodlayan lentivirüs, FuGene transfeksiyon metoduyla üretildi. Lentivirüs transfekte edilen NK92 hücrelerinde CAR ekspresyonu, anti-EGFRt ve/veya anti-mouse-Fab antikorları kullanılarak akım sitometri ile tespit edilmiştir.

Hedef hücreler, pCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro (Addgene) lentivirüsler ile işaretlenerek GFP ekspresyonları akım sitometre ile teyit edildi. SCID farelere 50.000 GFP+ RAJI hücresi intravenöz enjekte edilmiştir. Tümör gelişimi 2. haftada GFP ışınmasıyla IVIS-In vivo (Caliper Lumina 3) görüntüleme sistemiyle tespit edilmiştir. NK92 hücreleri, 10 milyon/500ul şeklinde 4 doz halinde enjekte edilmiştir. Hayvan



V.ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ

27-29 NİSAN 2018 – MALATYA

çalışmalarındaki katkıları için Arzu Temizyürek'e teşekkür ediyoruz.

BULGULAR

NK92 hücrelerinin ko-kültür testleri sonucunda sito-toksik etkinliği, biyolojik tekrarlı denemelerle, 10:1 dozunda, hematolojik kanser hücresi modellerinde, Daudi için >90%, RAJI için 63.5%, K562 için 62%; solid tümör modellerinde ise DMS-114 için 41.6% ve A549 için 17% tespit edildi. 24 saatlik ko-kültürde aktifleşmiş CD107a+ NK92 hücreleri Daudi testinde 19%, RAJI testinde 17.6% ve K562 testinde 27.8% olarak tespit edildi. SCID fare deneylerinde tümör modeli oluşturmak için >95% GFP ışına yapan RAJI hücreleri floresan mikroskopıyla gözlemlendi. Farelerde GFP ışınması 2. hafta görülmüş olup; farklı zamanlardaki NK92 uygulamaları sonucu tümör büyüklüğünün küçüldüğü tespit edilmiştir. GFP ekspresyonu yapabildiği (65.2%) gözlemlenen transgenik GFP-NK92 ile genetiğinin değiştirilebildiğini gösterildi. Takiben, NK92 hücrelerine anti-CD19 CAR kodlayan lentivirüs transfekte edildi ve >97% CAR ekspresyonu yapan CAR-NK92 hücre üretimi başarıldı.

SONUC

Gerçekleştirilen pre-klinik çalışmada, NK92'nin hedef hematolojik kanser hücreleri (RAJI, Daudi, K562) ve solid kanser hücreleri (A549, DMS-114) üzerinde in vitro sito-toksik etkinliği değerlendirilmiştir. NK-92 hücreleri, hematolojik kanserlerde daha yüksek düzeyde olmakla birlikte solid tümörlerde de (özellikle yüksek NK92 dozlarında) sitolitik etki göstermiştir. İkinci aşama in vivo testlerinde SCID farelerde GFP+ RAJI tümör oluşumunu takiben NK-92 tedavisi uygulanmıştır. Uygulanan NK92 sonrasında tümör progresyonunun geriletildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, CD19 pozitif kanser türlerine spesifik transgenik CAR-NK92 üretimi gerçekleştirilerek pre-klinik testlere hazır hale getirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, NK-92 hücrelerinin klinik fazlarda test edilmesinin ve klinik immünoterapi uygulamaları arasında değerlendirilmesinin uygunluğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELE

NK92, CAR-NK92, Immunoterapi, Natural Killer