

Jean-Marc Hubert Raymond Hoffmann
Dr. med.

Einfluss von Zytokinen auf die Verteilung von T-Zell-Subpopulationen bei der Transduktion mit Chimären Antigen-Rezeptoren (CARs)

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael Schmitt

Einleitung

Die Therapie mit gentechnisch veränderten T-Zellen, die chimäre Antigenrezeptoren (CAR) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (CART-Zellen), hat insbesondere in der Therapie CD19-positiver Erkrankungen bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt. Die Effektivität der CART-Zellen *in vivo* könnte von dem Verhältnis aus transfundierten naiven (T_N) vs. Effektor- (T_E) T-Zellen abhängig sein, da naive T-Zellen durch ihre Reifung zu weiterdifferenzierten Effektorzellen für eine langandauernde anti-Tumor-Aktivität verantwortlich sind. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Faktoren untersucht, die einen Einfluss auf die Verschiebung des Verhältnisses von Effektor- zu naiven CART-Zellen (T_N/T_E -Ratio) haben.

Material und Methoden

CART-Zellen wurden durch die Transduktion von PBMCs mit einem retroviralen Vektor der 3. Generation CD19.CAR.CD28.CD137.zeta unter zwei unterschiedlich stimulierenden Kulturbedingungen hergestellt: Aktivierung mittels anti-CD3-/anti-CD28-Antikörper mit einerseits Stimulation durch Interleukin (IL)-7 und IL-15 sowie andererseits durch IL-2. Die CART-Zell-Kulturdauer betrug 20 Tage. Die Zusammensetzung der zellulären Subpopulationen bei 24 gesunden Spendern und 11 unbehandelten Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) wurden aus Zellproben des peripheren Blutes bestimmt und daraufhin CART-Zellen von sechs ausgewählten Spendern (drei gesunden Spendern und drei unbehandelten CLL-Patienten) hergestellt. Die Daten wurden mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie sowie mittels Chrom-Freisetzungssays gewonnen.

Ergebnisse

IL-7/IL-15 waren verantwortlich für eine starke Differenzierung zu langlebigen T_N und „stem cell memory“ (T_{SCM} ; naive CD27+CD95+ T-Zellen), CD4+ und CXCR3+ CART-Zellen. IL-2 hingegen bewirkte eine Erhöhung des Prozentsatzes der Effector Memory (T_{EM}), CD56+ und CD4+ T regulatorischen (T_{Reg}) CART-Zellen. Die Expansion der verschiedenen CART-Zell-Subpopulationen (T_N , „central memory“ (T_{CM}), T_{EM} , T_E u.a.) wurde über den Verlauf der Kultur miteinander verglichen. Insbesondere unterschied sich die Vermehrung der CD4+ $CART_N$ -Zellen signifikant zwischen beiden Gruppen. Bei gesunden Spendern war es möglich, diese Subpopulation um das >60-fache zu vermehren, während CD4+ $CART_N$ -Zellen aus Proben von unbehandelten CLL-Patienten nur auf weniger als das 10-fache expandierten. Ebenfalls zeigte sich an Tag 10 der Kultur, dass die Expression des Erschöpfungsmarkers „programmed cell death 1“ (PD-1) deutlich auf der Zelloberfläche von Patienten-Proben im Vergleich zu Proben von gesunden Spendern erhöht war. Die T_N/T_E -Ratio am Ende der Kultur blieb <0,3 bei Proben von unbehandelten CLL-Patienten, unabhängig vom Zytokincocktail (IL-7/IL-15 vs. IL-2), während diese Ratio Werte >2 für Proben von gesunden Spendern unter Stimulation mit IL-7 und IL-15 erreichte. Somit konnte die effizienteste $CART_N$ -Zell-Expansion in Proben von gesunden Spendern und unter Stimulation mit IL-7/IL-15 nachgewiesen werden.

Diskussion

CART-Zellen konnten sowohl aus Proben von gesunden Spendern als auch von unbehandelten

CLL-Patienten hergestellt werden. Unbehandelte CLL-Patienten stellen jedoch eine besondere Herausforderung für die CART-Zell-Herstellung mit Blick auf eine langfristige Effektivität der CART-Zellen *in vivo* dar, da es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, eine hohe Anzahl an langlebigen T_N-Zellen zu generieren. Grund hierfür ist die mögliche Aufnahme eines Großteils der zugeführten stimulatorischen Zytokine (insbesondere IL-7/IL-15) durch die CLL-Zellen, wodurch weniger Zytokine für die produzierten CART-Zellen zur Verfügung standen. Daraufhin war vermutlich die Vermehrung der wenig-differenzierten CART_N-Zellen gestört, da diese für eine starke Expansion auf die Zytokine IL-7/IL-15 angewiesen sind. Dieser Mangel an Zytokinen führte folglich zum erhöhten Anteil an erschöpften (PD1+) T_N- und T_{CM}-Zellen innerhalb der Proben der unbehandelten CLL-Patienten, die an Tag 10 nachgewiesen werden konnten. Die Kombination eines Zytokincocktails wie IL-7/IL-15, der die naiven Zellen stimuliert, und einer Aufreinigung der PBMCs vor Beginn der CART-Zell-Herstellung könnten eine Möglichkeit darstellen, auch bei CLL-Patienten eine hohe T_N/T_E-Ratio zu generieren und ein verbessertes Ansprechen des CART-Zell-Produktes im Patienten zu ermöglichen.