

Hyeon Joo Yoo
Dr. med.

Tumor-specific reactive oxygen species accelerators for improved chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in B cell malignancies

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

Die zelluläre Immuntherapie mit genetisch modifizierten T-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) aufweisen, hat vor allem im Rahmen der Behandlung von CD19-positiven hämatologischen Malignitäten bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt. Die immunsuppressive Natur des Tumormikromilieus einschließlich des erhöhten Levels reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bietet jedoch erhebliche Einschränkungen. Der wissenschaftliche Fokus der vorliegenden Arbeit zielte darauf ab, den Anstieg der ROS-Spiegel in der Tumormikroumgebung zu nutzen, um die Antitumoraktivität der CAR-T-Zell-Therapie durch synergistischen Einfluss der ROS-Akzeleratoren im Sinne eines tumorspezifischen Prodrugs zu verbessern. ROS-Akzeleratoren werden spezifisch in Krebszellen aktiviert und induzieren eine weitere Erhöhung des ROS-Spiegels sowie deren Akkumulation intrazellulär, so dass die Tumorzellen anfälliger für die CAR-T-Zellen werden.

CAR-T-Zellen wurden durch die Transduktion gesunder peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) mit einem retroviralen Vektor der 3. Generation CD19.CAR.CD28.CD137.zeta unter Aktivierung via Anti-CD3 / Anti-CD28-Anti-körper mit Interleukinstimulation über IL-7 und IL-15 hergestellt. Die meisten CAR-T-Zellen wurden am Tag 14 kryokonserviert. Die gesamte Kulturzeit betrug 20 Tage, um die Qualität chronologisch zu evaluieren. Die Zytotoxizität mit oder ohne ROS-Akzeleratoren wurde hauptsächlich mittels Chrom-Freisetzungssassays bestimmt. Der Einfluss von ROS-Akzeleratoren auf den Phänotyp beziehungsweise die Leistungsfähigkeit gemäß funktionaler Eigenschaft der CAR-T-Zellen wurde grundsätzlich durch multiparametrische Durchflusszytometrie analysiert. Des Weiteren wurde die Erzeugung von intrazellulärem oxidativem Stress über PipFcB untersucht, indem die Zielzellen sowie die CAR- und Non-Transduced T-Zellen mit Dichlor-Dihydro-Fluorescein-Diacetat (DCFH-DA) angefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Die Kombination von CAR-T-Zellen mit PipFcB im Sinne eines tumorspezifischen ROS-Akzelerators erhöhte ihre zytotoxische Kapazität in Burkitt-Lymphomzelllinien wie Daudi und Raji sowie in primären Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL)-Zellen signifikant. Darüber hinaus verstärkte PipFcB auch die durch CAR-T-Zellen induzierte Antitumoraktivität. Die Vorbehandlung von Tumorzellen mit PipFcB führte insgesamt zu einer stärkeren Lyse. Außerdem zeigten die Tumorzellen eine signifikant höhere Anfälligkeit für die PipFcB-vermittelte Induktion von oxidativem Stress im Vergleich zu den T-Zellen. Die 48-stündige Exposition von CAR-T-Zellen gegenüber PipFcB zeigte keinen langfristigen Einfluss auf die Erschöpfung, Lebensfähigkeit und/oder Subpopulation. Zudem wurde zu keinem Zeitpunkt ein nennenswerter Einfluss von PipFcB auf die Degranulation oder die intrazelluläre Zytokinproduktion der CARTs beobachtet. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei den anderen ROS-Akzeleratoren inklusive Fe(HQ)₂ und BSO nachgewiesen werden. Somit führt die Kombination von CARTs mit ROS-Akzeleratoren zu einer interaktionsbedingten Verbesserung und

synergistischen Entwicklung der adoptiven Immuntherapie und trägt schließlich dazu bei, die durch die Tumormikroumgebung vermittelte Behandlungsresistenzen zu überwinden.

Neue Therapieansätze, die charakteristische Veränderungen der Mikroumgebung in malignen Zellen nutzen, wie zum Beispiel die intrazelluläre ROS-Akkumulation über einen modifizierten mitochondrialen Metabolismus mit Aussparung beziehungsweise nur geringerer off-Target-Toxizität, sind äußerst wünschenswert.

Es ist bereits bekannt, dass die CLL-Zellen den ROS-Akzeleratoren gegenüber außerordentlich empfindlich sind, da hierbei weitere Generationen und Akkumulationen von reaktiven Sauerstoffspezies induziert werden. Diese Eigenschaft scheint für die nachgewiesene Synergie der Antitumorwirksamkeit in der tumorspezifischen CAR-T-Kombinationstherapie verantwortlich zu sein.

Da PipFcb als spezifischer ROS-Akzelerator den intrazellulären oxidativen Stress in Tumorzellen erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Eigenschaften der CAR- oder Non-Transduced T-Zellen nimmt, ist der Haupteffekt vermutlich innerhalb der Zielzellen vorhanden. Für die *in vivo* Evaluation und Bewertung der Kombinationstherapie sind möglicherweise weitere Analysen und Behandlungen mit niedrigeren Konzentrationen des PipFcb notwendig. Die derzeit zur Verfügung stehenden tumorspezifischen ROS-Akzeleratoren könnten weiterhin entwickelt sowie optimiert werden, um ihre womöglich noch vorhandene off-Target-Toxizität zu reduzieren und schließlich vollständig zu verhindern. Eine kombinatorische Applikation und Anwendung zusätzlicher tumorspezifischer Aktivitätstrigger wie Hypoxie stellt ein potenzieller Beispielsansatz dar.

Weitere Demonstrationen unter komplexeren Kulturbedingungen, die die dreidimensionale *in vivo* Struktur von Tumorzellen widerspiegeln, könnten dazu beitragen, die Mechanismen des ROS-Akzelerator-vermittelten Synergismus mit CAR-T-Zellen näher zu verstehen und auf Basis dessen neue Therapieansätze darüber hinaus entsprechend zu erarbeiten. Zudem ist die zukünftige Evaluation der ROS-Akzeleratoren in Kombination mit CAR-T-Zellen in verschiedenen Mausmodellen erforderlich, um die *in vivo* Wirksamkeit des kombinatorischen CART-Behandlungsansatzes zu definieren.

Der Schutz der CAR-T-Zellen durch Implementierung von Katalase in das Konstrukt des Chimären Antigen-Rezeptors (CAR) könnte eine zusätzliche antioxidative Kapazität für CAR-T-Zellen bereitstellen, um deren Kapazitätsabfall im langfristigen Kulturprozess zu verhindern. Die Kombination von CAR-T-Zellen der vierten Generation mit ROS-Akzeleratoren im Sinne eines tumorspezifischen Arzneimittels mit synergistischen Einflüssen stellt somit ein vielversprechender, potenzieller Therapieansatz der CAR-T-basierten Behandlungen in Zukunft dar.