

Die FLT3-Kinase Inhibitoren Quizartinib und Midostaurin haben keinen Einfluss auf die Proliferation, Aktivierung und Reaktivität von primären humanen T-Zellen

Denise Wolleschak¹, Thomas S. Mack¹, Florian Perner¹, Tina M. Schnoeder¹, Marie C. Wagner¹, Stefanie Kliche², Burkhard Schraven², Satish Ranjan³, Berend Isermann³, Daniel B. Lipka^{1,4}, Thomas Fischer¹ und Florian H. Heidel¹

¹ Klinik für Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Innere Medizin, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, ² Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, ³ Institut für Klinische Chemie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, ⁴ Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Abteilung Epigenomics und Krebsrisikofaktoren, Heidelberg

Einleitung

FLT3-Inhibitoren wurden bereits erfolgreich als *Bridging*-Therapie vor allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit FLT3-ITD positiven akuten myeloischen Leukämie eingesetzt. Eine Reihe von Kinase-Inhibitoren (wie z.B. Imatinib bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie) wurden bereits erfolgreich auch nach allogener Stammzelltransplantation eingesetzt (während und auch nach Absetzen der Immunsuppression). Andererseits ist bekannt, dass Zweit-Generations-BCR-ABL-Inhibitoren wie zum Beispiel Dasatinib die Funktion primärer T-Zellen signifikant hemmen können und somit die Leukämie-spezifische Reaktivität (GvL) potentiell negativ beeinflussen. Dies geschieht vor allem durch Hemmung von SRC-Kinasen die für die T-Zell-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor essentiell sind. Aber auch Imatinib und Nilotinib - obwohl sie SRC-Kinasen nicht inhibieren - können in höheren Dosen die T-Zell Funktion beeinträchtigen. Zusammenfassend kann die potentielle T-Zell Hemmung durch FLT3-Inhibitoren im Kontext einer allogenen Stammzelltransplantation bei Patienten mit FLT3 positiver akuten myeloischen Leukämie eine kritische Rolle spielen. Derzeit werden die FLT3-Inhibitoren Midostaurin und Quizartinib in fortgeschrittenen klinischen Studien entwickelt. Daher ist es unser Ziel, diese klinisch relevanten Inhibitoren im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Aktivierung und Reaktivität von humanen T-Zellen zu untersuchen. Als Positivkontrolle dient der SRC-Inhibitor Dasatinib. Von allen Inhibitoren wurden klinisch relevante und erreichbare Konzentrationen eingesetzt (Dasatinib 10-50 nM, Midostaurin [PKC412] 5-50 nM, Quizartinib [AC220] 10-50 nM).

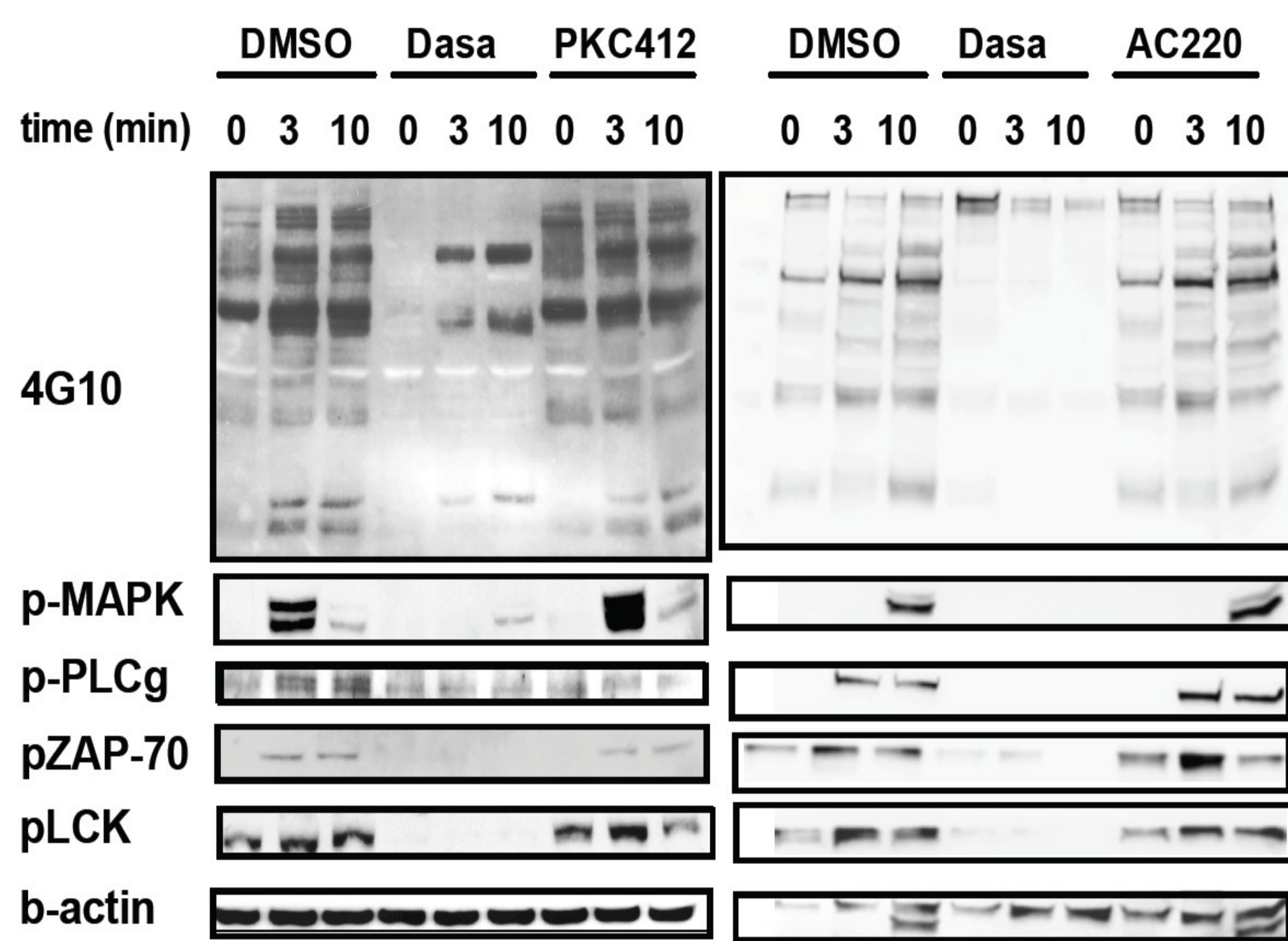


Abbildung 1: Die FLT3-Kinase Inhibitoren Midostaurin und Quizartinib haben keinen Einfluss auf die Aktivierung des T-Zell-Rezeptor-Signalweges. Primäre T-Zellen von gesunden Spendern wurden isoliert und mit verschiedenen Konzentrationen der Tyrosin-Kinase-Inhibitoren Midostaurin (5-50 nM), Dasatinib (10-50 nM) und Quizartinib (10-50 nM) zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt. Die Tyrosinphosphorylierung des T-Zell-Rezeptor-Signalweges wurde mittels Westernblot analysiert. Die Inkubation mit Dasatinib (50 nM und 10 nM), zeigte eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierung und des T-Zell-Rezeptor-Signalings. Midostaurin und Quizartinib reduzieren nicht die gesamte Tyrosinphosphorylierung und lassen die Aktivierung der nachfolgenden Kinasen (ZAP70, MAPK, LCK, PLCG1) weitestgehend unbeeinflusst.

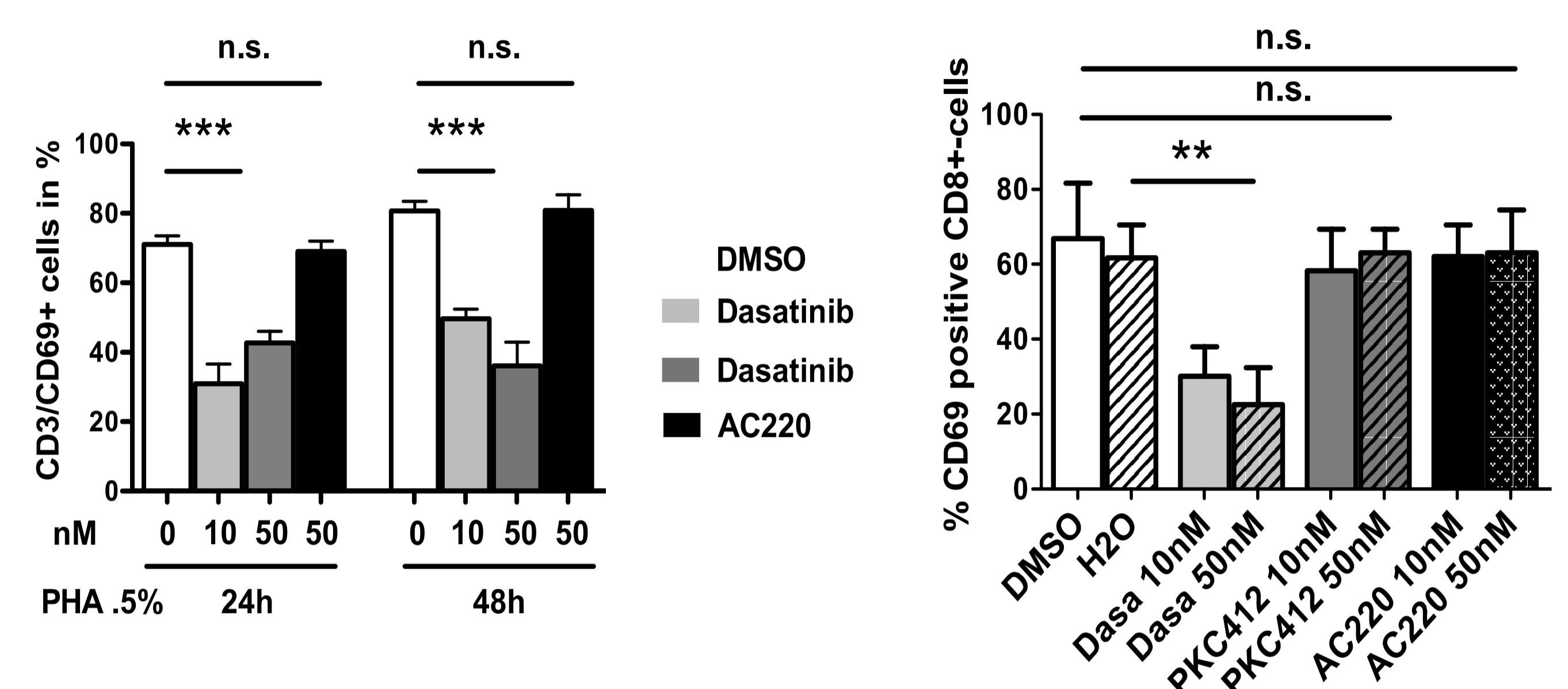


Abbildung 2: Klinisch relevante Dosen von Midostaurin und Quizartinib haben keinen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung (CD69 Expression): Um eine T-Zell-Stimulation zu erreichen wurden T-Zellen von gesunden Spendern mittels PHA 0,5% (linkes Bild) oder CD3/CD28 Beads (rechtes Bild) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Tyrosin-Kinase-Inhibitoren behandelt. Unter Verwendung der CD3/CD28 Stimulation zeigte sich nach einer Behandlung mit Dasatinib eine Abnahme der CD69 Expression. Die Behandlung der isolierten T-Zellen mit klinisch relevanten Dosen von Midostaurin oder Quizartinib zeigen keinen Einfluss auf die CD69 Expression. Die Expressionslevel waren sowohl unter PHA als auch CD3/CD28 Stimulation vergleichbar mit der DMSO Kontrolle - selbst unter einer Dosis von 50 nM Midostaurin oder Quizartinib.

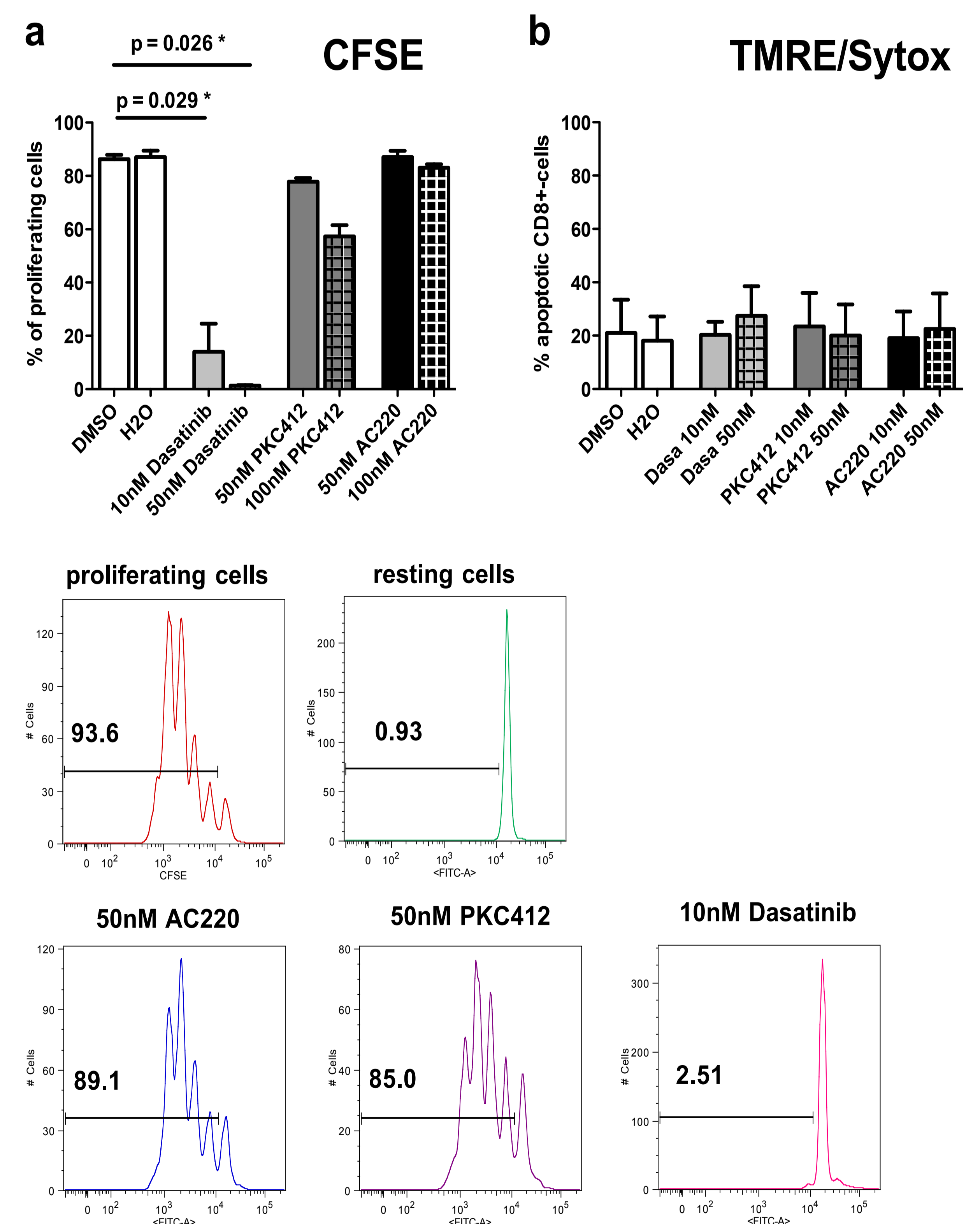


Abbildung 4: Dasatinib, jedoch nicht Midostaurin und Quizartinib hemmen die T-Zell-Proliferation. T-Zellen gesunder Spender wurden mit Dasatinib, Midostaurin und Quizartinib (Tyrosin-Kinase-Inhibitoren) und DMSO als Kontrolle prä-inkubiert und für 24h mit 0,5% PHA/ IL2 stimuliert. Die Proliferation wurde nach CFSE-Färbung mittels Durchflusszytometrie gemessen (a). Die CFSE-Färbung zeigt eine deutliche Proliferationshemmung von T-Zellen durch Dasatinib wohingegen Midostaurin und Quizartinib keinen Effekt auf die T-Zell-Proliferation haben. Parallel erfolgte die Untersuchung der Apoptoserate mittels SytoxBlue dead-cell-Färbung (b). Keiner der untersuchten Inhibitoren induzierte Apoptose über die Grund-Apoptose (DMSO-Kontrolle) hinaus.

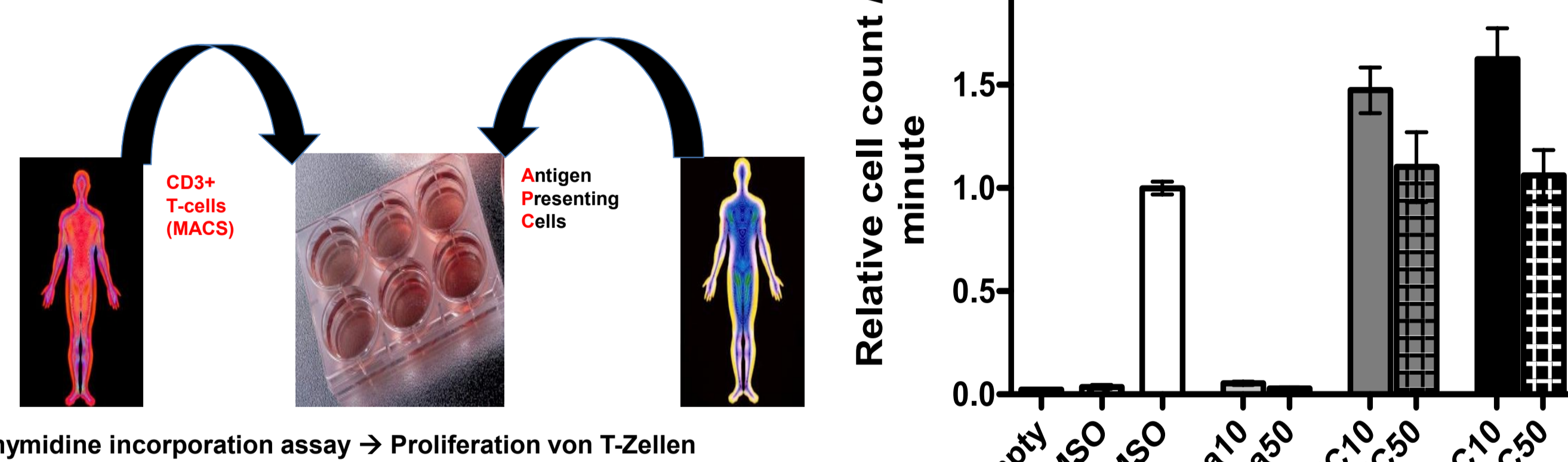


Abbildung 3: Die allogene T-Zell-Reaktivität bleibt durch Quizartinib und Midostaurin unbeeinflusst. T-Zellen von gesunden Spendern wurden isoliert, mit verschiedenen Inhibitoren prä-inkubiert und anschließend antigenpräsentierenden Zellen (APC) eines unverwandten Individuums präsentiert. Die T-Zellproliferation, gemessen mittels 3H-Thymidin-Inkorporation, war durch die Behandlung mit Dasatinib signifikant reduziert, nicht jedoch nach der Behandlung mit Midostaurin und Quizartinib.

Zusammenfassung:

•T-Zell Aktivität, Proliferation und Reaktivität sind *in vitro* durch klinisch relevante Dosen der FLT3-Kinase Inhibitoren Midostaurin und Quizartinib unbeeinträchtigt.

•Diese Informationen unterstützen die Sicherheit des Einsatzes von FLT3-Inhibitoren im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation. Diese könnten ohne signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Reaktivität (GvL-Effekt) überbrückend eingesetzt werden.

•Die laufenden Untersuchungen zum Einfluss auf Tumor- und Virus-Spezifische T-Zell-Antworten bestätigt mit präliminären Daten diese Ergebnisse.