

Aus der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Multiples Targeting mit Adapter-CAR (AdCAR)-T-
Zellen verhindert Therapieversagen durch
Antigenverlust in der Behandlung von malignen
B-Zell-Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Reiter, Selina

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. J. Skokowa

Tag der Disputation: 07.09.2020

Meinen Eltern
in großer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1. Hämatologische Grundlagen | 2 |
| 1.1 Hämatopoese | 2 |
| 1.2 T-Lymphozyten..... | 4 |
| 1.3 B-Lymphozyten..... | 5 |
| 1.4 Antikörper und Antigene | 7 |
| 2. Maligne Erkrankungen der B-Zellen | 9 |
| 2.1 Einteilung..... | 9 |
| 2.2 Akute lymphatische Leukämie..... | 10 |
| 3. CAR-T-Zellen | 12 |
| 3.1 Entwicklung und Aufbau der CAR-T-Zellen..... | 12 |
| 3.2 Herausforderungen der CAR-T-Zell-Forschung..... | 14 |
| 3.3 Antigenverlust als Problematik der Immuntherapie..... | 15 |
| 4. Adapter-CAR-T-Zellen (AdCAR)..... | 16 |
| 5. Zielsetzung dieser Arbeit..... | 19 |
| II. MATERIAL UND METHODEN..... | 20 |
| 1. Material..... | 20 |
| 1.1 Geräte | 20 |
| 1.2 Verbrauchsmaterialien | 21 |
| 1.3 Chemikalien und Reagenzien | 22 |
| 1.4 Antikörper und Zytokine..... | 23 |
| 1.5 Zellmaterial und Medien | 24 |
| 2. Methoden..... | 25 |
| 2.1 Zellkultur | 25 |
| 2.2 Durchflusszytometrie (FACS)..... | 26 |
| 2.3 Herstellung des lentiviralen Vektors..... | 30 |
| 2.4 Herstellung von AdCAR-T-Zellen..... | 32 |
| 2.4.1 PBMC-Isolierung..... | 33 |
| 2.4.2 Separation der CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen mit MACS-Technologie | 34 |
| 2.4.3 Stimulation der T-Zellen | 36 |
| 2.4.4 Weitere Schritte der AdCAR-T-Zell-Herstellung..... | 37 |
| 2.5 Luciferase-basierter Kill-Assay..... | 39 |
| 2.6 Statistische Auswertung..... | 43 |
| 2.7 FACS-basierter Kill-Assay | 44 |
| III. ERGEBNISSE..... | 46 |
| 1. Antigenscreening der Tumor-Zellkultur | 47 |
| 1.1 Expression von CD19 und CD20 auf JeKo-1-Varianten..... | 47 |
| 1.2 Expression von weiteren Antigenen auf JeKo-1-Varianten..... | 50 |
| 2. Vortitrationen mit JeKo-1..... | 53 |
| 2.1 Luciferase-Aktivität von JeKo-1 | 53 |
| 2.2 Effektor-Target-Verhältnis und Antikörper-Konzentration | 55 |

| | |
|---|------------|
| 3. Steuerbarkeit der Lyse von Tumorzellen durch AdCAR-T-Zellen | 58 |
| 3.1 Antigen- und Antikörper-abhängige Lyse von Tumorzellen | 60 |
| 3.2 Entwicklung der Lyse über die Zeit | 64 |
| 3.3 Vergleichbarkeit der AdCAR-T-Zellen verschiedener Spender | 66 |
| 4. Vergleich von AdCAR-T-Zellen und CD19-/GD2-CAR-T-Zellen | 68 |
| 5. Flexibilität mit kombiniertem Targeting bei Antigenverlust | 71 |
| 5.1 Multiples Targeting im Luciferase-basierten Kill-Assay..... | 72 |
| 5.2 Multiples Targeting im FACS-basierten Kill-Assay | 75 |
| 5.3 Sequenzielles Targeting im FACS-basierten Kill-Assay | 78 |
| 6. Selektivität durch kombiniertes unterschwelliges Targeting | 81 |
| | |
| IV. DISKUSSION | 87 |
| 1. Die Relevanz einer neuen Therapie..... | 87 |
| 2. Repräsentativität der Ergebnisse | 91 |
| 2.1 Ausgewählte Zielstrukturen für spezifisches Killing | 91 |
| 2.2 Das Mantelzell-Lymphom JeKo-1 | 92 |
| 3. Die drei Säulen der Tumorthherapie mit AdCAR-T-Zellen | 94 |
| 3.1 Steuerbarkeit der AdCAR-Funktion | 94 |
| 3.2 Flexibilität bei Therapieversagen durch Antigenverlust..... | 96 |
| 3.3 Selektivität mittels Surface Activation Matrix..... | 102 |
| 4. Ausblick | 105 |
| | |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 106 |
| | |
| VI. VERZEICHNISSE | 108 |
| 1. Literaturverzeichnis..... | 108 |
| 2. Abbildungsverzeichnis | 116 |
| 3. Tabellenverzeichnis | 118 |
| | |
| VII. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL..... | 119 |
| | |
| VIII. DANKSAGUNG | 120 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AdCAR | adapter chimeric antigen receptor |
| ADCC | antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | Antigen-präsentierende Zellen |
| B-ALL | akute lymphatische B-Zell-Leukämie |
| b[mAb] | biotinylierter Antikörper, [mAb] ersetzt durch Target-Antigen |
| bControl | biotinylierter Kontrollantikörper (REA Control-Biotin) |
| BCR | B-Zell-Rezeptor |
| CAR | chimeric antigen receptor |
| CD | cluster of differentiation |
| CDC | complement-dependent cytotoxicity |
| CH | Schweiz |
| CLL | chronische lymphatische Leukämie |
| D | Deutschland |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| E:T-Ratio | effector cell to target cell ratio (Effektor-Target-Verhältnis) |
| Fab | fragment antigen binding |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| Fc | fragment crystallizable |
| FCS | fetal calf serum |
| FDA | food and drug administration |
| FITC | fluorescein isothiocyanate |
| FSC | forward light scatter |
| g | relative Erdbeschleunigung |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |

| | |
|----------------|---|
| JPN | Japan |
| LLE | linker label epitope |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| MACS | magnetic activated cell sorting |
| MFIR | median fluorescence intensity ratio |
| MHC | major histocompatibility complex |
| MRD | minimal residual disease |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl der Einzelmessungen |
| n _Σ | Gesamtzahl der Messungen |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| PBS | phosphat buffered saline |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cell |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PE | Phycoerythrin |
| POL | Polen |
| PP | Polypropylen |
| PS | Polystyren |
| R | Bremse |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | Surface Activation Matrix |
| SD | standard deviation (Standardabweichung) |
| SSC | sideward light scatter |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| vs. | versus |

I. EINLEITUNG

Zu Beginn dieser Einleitung werden die hämatologischen Grundlagen beschrieben, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit relevant sind. In einem zweiten Schritt wird auf maligne B-Zell-Erkrankungen, insbesondere die akute lymphatische Leukämie (ALL), eingegangen. Anschließend werden die CAR-T-Zellen thematisiert, eine immuntherapeutische Behandlungsmethode der ALL. Dabei werden die Vor- und Nachteile dieser Therapieform erörtert. Dann werden die AdCAR-T-Zellen vorgestellt, mit denen sich diese Arbeit in erster Linie beschäftigt und die eine Weiterentwicklung der CAR-T-Zell-Therapie darstellen. Am Ende der Einleitung wird die Zielsetzung dieser Arbeit definiert.

In den darauffolgenden Kapiteln werden die verwendeten Materialien und Methoden sowie die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche vorgestellt. Diese Versuchsergebnisse werden anschließend mit Bezug auf die Zielsetzung dieser Arbeit und die Herausforderungen der CAR-T-Zell-Therapie diskutiert. Zum Abschluss werden die wichtigsten Erkenntnisse dieser Dissertation zusammengefasst.

1. Hämatologische Grundlagen

1.1 Hämatopoese

Das Immunsystem des menschlichen Organismus besteht aus einer angeborenen und einer adaptiven Immunabwehr. Die Zellen, die an beiden Abwehrsystemen beteiligt sind, entstehen aus hämatopoetischen pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Aus diesen Vorläuferzellen bilden sich zwei Hauptgruppen aus: die myeloische und die lymphatische Zelllinie (siehe *Abb. I-1*). In der myeloischen Zelllinie entwickeln sich die Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen, die Teil der angeborenen Immunabwehr sind; außerdem differenzieren sich aus derselben myeloischen Vorläuferzelle die Thrombozyten und Erythrozyten aus. Die lymphatische Zelllinie bringt im Grunde drei verschiedene Zelltypen hervor: die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die B-Lymphozyten (B-Zellen) und die T-Lymphozyten (T-Zellen). Die NK-Zellen sind der angeborenen Immunabwehr zugehörig, da sie zwar u. a. bei Kontakt mit virusinfizierten Zellen aktiviert werden, aber nicht spezifisch auf ein Antigen reagieren. Für die Entstehung einer adaptiven – also antigenspezifischen – Immunantwort sind die B- und T-Zellen verantwortlich [1].

Diese beiden Zelltypen der lymphatischen Zelllinie sowie deren Funktionen werden zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

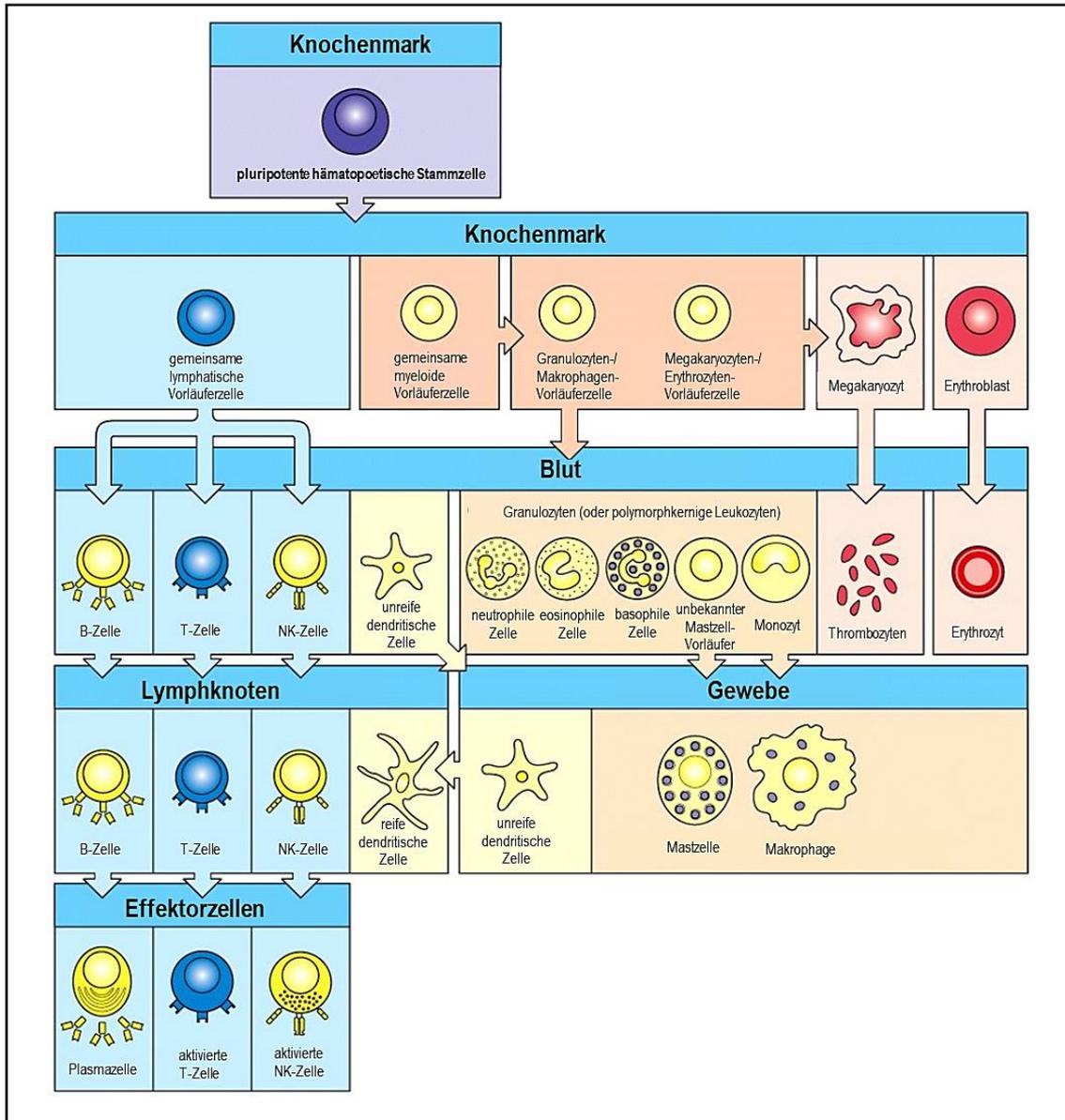


Abb. I-1 Schema der Hämatopoese

Im Knochenmark entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen die lymphatische und die myeloische Zelllinie. In der myeloischen Zelllinie bilden sich u. a. Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten aus, während in der lymphatischen Zelllinie B-, T- und NK-Zellen entstehen.

[Adaptiert aus *Murphy, Travers et al. 2014 – Janeway Immunologie*]

1.2 T-Lymphozyten

Die Bezeichnung T-Zellen leitet sich von *Thymus* ab, da einige Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung aus dem Knochenmark auswandern und sich im Thymus niederlassen. Im Thymuscortex bilden die Vorläuferzellen unreife T-Zellen aus, die Thymozyten. Im Thymusmark entwickeln diese sich in Verbindung mit dendritischen Zellen und Makrophagen zu reifen T-Zellen weiter.

Das Reifungsstadium und die Funktion einer T-Zelle werden mitunter durch ihre Oberflächenantigene bestimmt, wobei es sich bei den wichtigsten Strukturen um CD3, CD4 und CD8 handelt. Aus den Thymozyten, die noch keines dieser Antigene besitzen, entwickeln sich zum einen die $\gamma\delta$ -T-Zellen (CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻) und zum anderen die große Population der $\alpha\beta$ -T-Zellen, aus der sich die Gruppen der CD4-T-Zellen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻) und CD8-T-Zellen (CD3⁺, CD4⁻, CD8⁺) ausbilden.

T-Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der sich aus den jeweiligen Ketten $\alpha\beta$ bzw. $\gamma\delta$ sowie CD3 zusammensetzt. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen können – im Unterschied zu den B-Zellen – körperfremde Antigene nur erkennen, wenn diese ihnen durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) dargeboten werden. Dies geschieht durch spezielle Oberflächenstrukturen dieser APZ, die MHC-Proteine (Major Histocompatibility Complex). Jede kernhaltige Körperzelle exprimiert das MHC-I-Protein, mit dem es Virusbestandteile oder prozessierte Tumorstrukturen präsentieren kann.

MHC-I wird von CD8-T-Zellen erkannt, die damit zu zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden. Diese besitzen die Fähigkeit, selektiv die APZ zu töten, indem sie u. a. das zytotoxische Protein Perforin freisetzen, das die Zellmembran der Zielzelle für Enzyme (Granzyme) durchlässig macht. Granzyme aktivieren intrazellulär Caspasen und lösen damit die Apoptose der Zelle aus. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen sind spezielle APZ, die das MHC-II-Protein exprimieren. Sie präsentieren Peptide von Erregern, die phagozytiert oder über den B-Zell-Rezeptor (vgl. Kapitel I.1.4) aufgenommen wurden. MHC-II wird von CD4-T-Zellen gebunden, die sich anschließend zu mehreren Subtypen von T-Helferzellen differenzieren können, wobei es sich hierbei vornehmlich um

T_H1- oder T_H2-Zellen handelt. T_H1-Zellen spielen bei bakteriellen Infektionen eine Rolle, indem sie Makrophagen dazu anregen, antibakterielle Substanzen zu produzieren sowie die Verschmelzung von Lysosomen und den bakterienhaltigen Vesikeln beschleunigen. Zudem stimulieren sie die Produktion von spezifischen Antikörpern in B-Zellen. T_H2-Zellen aktivieren ebenso naive B-Zellen und können zusätzlich in diesen einen Isotopenswitch der Immunglobuline – IgM zu IgG, IgE oder IgA – induzieren [1].

1.3 B-Lymphozyten

B-Zellen, deren Name sich von *Bursa fabricii* (Vogelorgan zur Lymphozytenreifung) ableitet, entwickeln sich im Knochenmark durch Stimuli der dortigen Stromazellen aus den hämatopoetischen Stammzellen. Dabei durchlaufen die B-Zellen diverse Stadien, in denen verschiedene Oberflächenantigene exprimiert werden (siehe *Abb. I-2*).

Die B-Zellen zirkulieren in ihrer naiven bzw. ungeprägten Form im Blut und den lymphatischen Organen, bis ein Antigen an ihren B-Zell-Rezeptor (BCR) bindet. Nach Costimulation durch eine T-Helferzelle differenzieren sich die B-Zellen im Lymphknoten zu Plasmazellen und proliferieren. Die entstandenen Plasmazellen sezernieren Antikörper, die auch Immunglobuline (Ig) genannt werden [1].

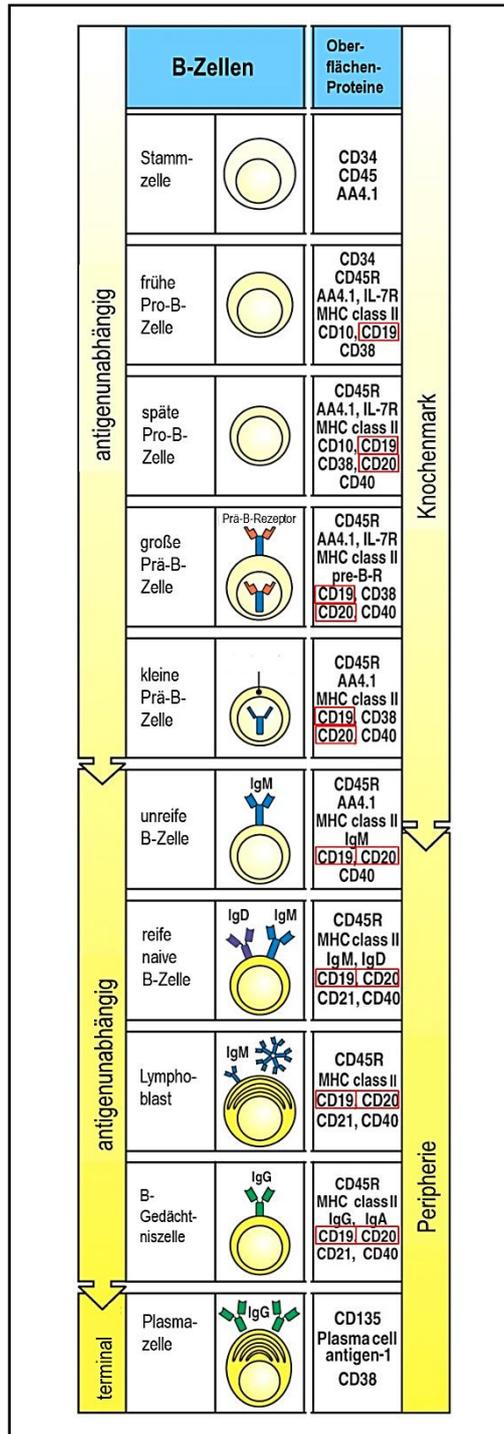


Abb. I-2 Entwicklungsstadien der B-Zelllinie

Die Entwicklung der B-Zelllinie findet zunächst im Knochenmark und anschließend in der Peripherie statt. Hierbei verändern sich beim Durchlaufen der Stadien auch die Oberflächenmarker der Zellen, wobei in dieser Arbeit u. a. der Fokus auf der – ab der späten Pro-B-Zelle – durchgängigen Expression von CD19 und CD20 liegt.

[Adaptiert aus *Murphy, Travers et al. 2014 – Janeway Immunologie*]

1.4 Antikörper und Antigene

Die von den Plasmazellen sezernierten Immunglobuline binden spezifisch pathogene Strukturen und aktivieren andere Zellen zur Zerstörung des gebundenen Antigens. Sie stellen eine lösliche Form des B-Zell-Rezeptors (BCR) dar, der auf der B-Zell-Oberfläche als Antigenrezeptor dient. Eine Plasmazelle produziert monoklonale Antikörper, d. h. sie sind alle für dasselbe Antigen spezifisch.

Immunglobuline besitzen eine antigenbindende variable Region (V-Region) sowie eine konstante Region (C-Region), wobei letztere die Effektormechanismen auslöst. Ihre Struktur stellt ungefähr eine Y-Form dar und besteht aus je zwei gepaarten schweren (H) und leichten (L) Polypeptidketten. Jeweils eine leichte und eine schwere Kette bilden eine V-Region, die als Antigenbindungsstelle fungiert; somit gibt es an einem Antikörper zwei Bindungsstellen. Die beiden Arme des Y werden auch als Fab (fragment antigen binding) bezeichnet. Zwei schwere Ketten bilden die Basis des Y mit der C-Region, die Fc (fragment crystallizable) genannt wird (siehe *Abb. 1-3*). Die schweren Ketten bestimmen auch den Immunglobulin-Typ: IgM, IgD, IgG, IgA oder IgE, wobei das beim Menschen am häufigsten vorkommende Immunglobulin das IgG ist [2].

Antigene sind jene Strukturen, die von Antikörpern erkannt werden. In dieser Arbeit geht es diesbezüglich vor allem um die Zelloberflächenproteine CD19, CD20 (CD = cluster of differentiation) und ROR1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1), die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

CD19

Hierbei handelt es sich um einen Biomarker für normale und neoplastische B-Zellen sowie folliculäre dendritische Zellen. CD19 gehört zur Ig-Familie und ist ein 95kDa großes Transmembranprotein mit einer einfachen Transmembrandomäne. Der Rezeptor moduliert B-Zell- und MHC-II-Signalwege und interagiert u. a. mit dem BCR. Er trägt zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen antigeninduzierter Immunantwort und Toleranzentwicklung bei [3].

CD20

CD20 findet sich auf fast allen normalen und neoplastischen B-Zellen. Es gehört zur MS4A-Familie und besitzt vier Transmembrandomänen. Über die physiologische Funktion ist nur wenig bekannt, Vermutungen legen aber nahe, dass der Rezeptor über eine Interaktion mit dem BCR als Calciumkanal agiert [4].

ROR1

ROR1 wird in undifferenziertem embryonalem Stammzellgewebe, B-CLL (Chronische lymphatische Leukämie) und Mantelzell-Lymphomen hoch exprimiert; zudem ist es auf Fettzellen und frühen B-Zellen in geringerem Ausmaß und in noch geringerer Ausprägung auf Pankreas- und Lungengewebe vorhanden. Es gehört zu den Ig-ähnlichen Rezeptoren und besitzt eine Transmembrandomäne. ROR1 ist unter anderem an der embryonalen Strukturbildung und Neurogenese beteiligt, verhindert die Apoptose und verstärkt den EGFR-Signalweg [5].

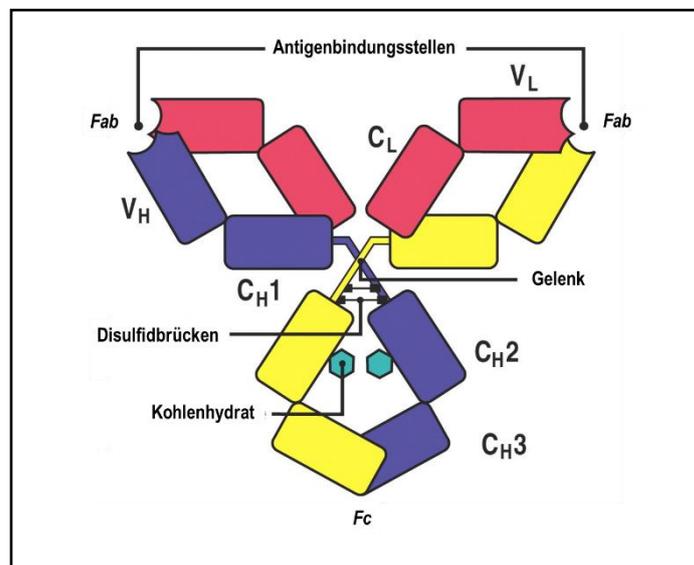


Abb. I-3 Struktur eines Antikörpers

Antikörper sind aus je zwei schweren (H, in der Abbildung gelb und violett) und zwei leichten (L, in der Abbildung rot) Ketten aufgebaut, wobei je eine schwere und eine leichte Kette eine Antigenbindungsstelle bilden. Die beiden antigenbindenden Arme des Antikörpers werden Fab, die Basis Fc genannt.

[Adaptiert aus *Murphy, Travers et al. 2014 – Janeway Immunologie*]

2. Maligne Erkrankungen der B-Zellen

2.1 Einteilung

Durch genetische Veränderungen in einer B-Zelle können sich Formen einer Leukämie oder eines Lymphoms entwickeln. Die Neoplasie ist klonal und besitzt Merkmale des B-Zell-Entwicklungsstadiums, aus dem sie entstanden ist, beispielsweise dessen Oberflächenantigene oder die Fähigkeit, sich an einem bestimmten Zielort niederzulassen (siehe *Abb. I-4*).

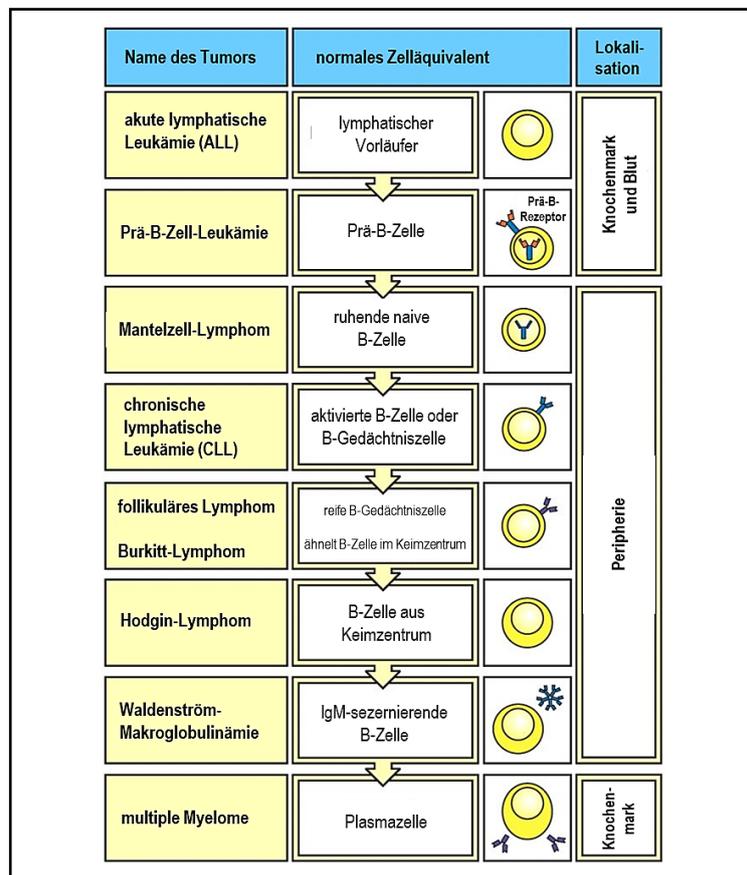


Abb. I-4 B-Zell-Erkrankungen und ihre Ursprungszelle

Die Form einer Leukämie bzw. eines Lymphoms lässt Rückschlüsse auf das Stadium der B-Zelle zu, aus der die Neoplasie entstanden ist. Darum stimmen auch deren Eigenschaften, z. B. Oberflächenmarker, meist mit der Ursprungszelle überein.

[Adaptiert aus *Murphy, Travers et al. 2014 – Janeway Immunologie*]

Grundsätzlich lassen sich maligne Erkrankungen der B-Zellen in akute lymphatische Leukämien (B-ALL) und maligne B-Zell-Lymphome, zu denen auch die chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) gezählt wird, unterteilen. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal hierbei ist, dass die ALL aus lymphatischen B-Zell-Vorläufern, also unreifen Zellen im Knochenmark, hervorgeht. Dagegen entstehen Lymphome meist aus reifen bzw. aktivierten Zellen des peripheren lymphatischen Systems. Überschneidungen der beiden Gruppen sind möglich [1].

2.2 Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist mit einer Inzidenz von circa 3 Fällen/100 000 Personen zwischen 0 und 19 Jahren die häufigste maligne pädiatrische Erkrankung. Der Inzidenzgipfel liegt zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr, anschließend steigt das Risiko ab dem 50. Lebensjahr erneut an. Die ALL stellt 25% aller Krebsdiagnosen und 80% aller Leukämien im Kindesalter dar; im Vergleich dazu macht sie nur <1% der Karzinome im Erwachsenenalter aus. Circa 86% der neudiagnostizierten Fälle sind B-phänotypisch (B-ALL) und 14% T-phänotypisch (T-ALL). Durch ein immer besseres Verständnis der Tumorbiologie kann heutzutage eine Heilungsrate von bis zu 90% erreicht werden. Dennoch stellt die B-ALL die häufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen bei Kindern dar. Für Erwachsene liegt die Heilungsrate bei 20-40% [6, 7].

Die Einteilung der B-ALL folgt den AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 für durchflusszytometrische Immunphänotypisierung und beschreibt vier Arten der B-ALL: Pro-B-ALL, Common-B-ALL, Prä-B-ALL und reife B-ALL (B-I bis B-IV) [8].

Die ALL ist durch eine Überproduktion von Lymphoblasten im Knochenmark charakterisiert. Diese befinden sich in einem frühen Entwicklungsstadium und sind unfähig zur Differenzierung. Das klinische Bild der Erkrankung erklärt sich durch die Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks durch die Lymphoblasten und kann schwere, wiederkehrende Infektionen durch eine

Granulozytopenie, Blutungsneigung durch eine Thrombozytopenie, Anämie, Schmerzen und Müdigkeit beinhalten.

Die Standardbehandlung der ALL in Deutschland richtet sich nach den Studien ALL-BFM und COALL und besteht aus drei Behandlungsphasen: Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie. Bei der Induktionstherapie kommen Kortikosteroide (z. B. Dexamethason) und Chemotherapeutika (z. B. Vincristin, Asparaginase und Anthrazykline) zum Einsatz; letztere werden ebenfalls bei der Konsolidierungstherapie verwendet. Hierbei kann für Hochrisikopatienten bzw. bei Therapieversagen auch eine allogene Stammzelltransplantation erwogen werden. Die Erhaltungstherapie besteht aus Zytostatika in geringerer Dosierung. Ohne Behandlung gilt die Erkrankung ALL als fatal. Zur Überwachung des Therapieerfolgs wird die MRD (minimal residual disease) per PCR (polymerase chain reaction) oder Durchflusszytometrie gemessen. Die MRD bezeichnet den Anteil der verbleibenden Blasten in einem Knochenmarkspunktat [9].

Wie alle Chemotherapeutika weisen auch die bei der ALL-Therapie verwendeten Medikamente eine hohe Toxizität auf. Typische Nebenwirkungen sind u. a. Übelkeit, Knochenmarksdepression und Mukositis. Hinzu kommen spezifische Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen, z. B. Bluthochdruck und Hyperglykämie bei Kortikosteroiden, Neuropathien bei Vincristin, Pankreatitis bei Asparaginase und Kardiotoxizität bei Anthrazyklinen (Doxorubicin/Daunorubicin) [10].

Neuere Therapieansätze nutzen bestimmte Antigene der Tumorzellen als Zielstruktur, um eine Immunantwort zu erzeugen, und werden deshalb als ‚targeted immunotherapies‘ bezeichnet. Diese gezielten Immuntherapien wirken über Mechanismen wie ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) und CDC (complement-dependent cytotoxicity) und führen zu einer Lyse der Tumorzelle durch das Immunsystem. Hierzu zählen beispielsweise der monoklonale CD20-Antikörper Rituximab, das CD22-Immunkonjugat Inotuzumab ozogamicin, der bispezifische CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab sowie die CAR-T-Zellen (chimeric antigen receptor), mit denen sich diese Arbeit befasst [11, 12].

3. CAR-T-Zellen

3.1 Entwicklung und Aufbau der CAR-T-Zellen

Die Fähigkeiten von zytotoxischen CD8-T-Zellen wurden seit den 1980er-Jahren mit dem Erkennen des Zusammenspiels von MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor (TCR) immer besser verstanden. Wie bereits in Kapitel I.1.2 erwähnt, präsentieren die meisten Körperzellen über MHC-I Moleküle, die von Zellstrukturen, Pathogenen oder entarteten Proteinen abstammen. CD8⁺-T-Zellen erkennen diese mit ihrem spezifischen TCR und können so infizierte oder maligne Zellen aufspüren und lysieren. Die Idee, diese Fähigkeiten als Immuntherapie zur Behandlung maligner Erkrankungen zu nutzen, machte in der Forschung innerhalb kurzer Zeit einen bemerkenswerten Fortschritt [13].

So können tumorspezifische T-Zellen aus Vollblut isoliert, expandiert und reinfundiert werden; allerdings sind solche tumorspezifischen Zellen nicht immer vorhanden oder schwierig zu expandieren. Einen breiteren Ansatz bietet die gentechnische Veränderung polyklonaler T-Zellen, um die Expression eines TCR, der spezifisch für ein bestimmtes Tumorantigen ist, herbeizuführen. Diese Therapieform ist allerdings davon abhängig, dass die Tumorzellen passende Antigene über MHC-I präsentieren. Durch Escape-Mechanismen, wie die Downregulation des MHC-I-Komplexes oder der Strukturen, die zur Präsentation eines Antigens notwendig sind, können die Tumorzellen den T-Zellen entgehen [14].

Die Suche nach einer MHC-unabhängigen Nutzung der T-Zell-Funktion führte in den späten 1980er-Jahren durch die Pioniere Gross et al. und Kuwana et al. zur Erstbeschreibung von T-Zellen, die mit einem Gen für einen chimären Antigen-Rezeptor transfiziert wurden, einer Kombination aus TCR und monoklonalem Antikörper (mAb) [15, 16].

Die Grundstruktur des CAR (siehe *Abb. I-5*) enthält eine extrazelluläre Domäne, das scFv (single chain variable fragment), das aus den variablen Anteilen der schweren und leichten Ketten eines monoklonalen Antikörpers besteht und die spezifische

Antigenbindung des CAR bewirkt. Weitere Bestandteile des CAR werden durch einen extrazellulären Spacer (aus IgG-Bauteilen), der den Abstand zwischen dem Bindungsepitop der Tumorzelle und der T-Zell-Oberfläche bestimmt, sowie eine Transmembrandomäne (aus CD3-, CD4-, CD8- oder CD28-Segmenten) gebildet. Die CARs der ersten Generation besitzen eine intrazelluläre CD3ζ(zeta)-Domäne, die sich vom TCR ableitet und die intrazelluläre Aktivierungskaskade startet. CARs der zweiten Generation besitzen zusätzlich eine, CARs der dritten Generation zusätzlich zwei costimulatorische Domänen aus Abschnitten von beispielsweise CD28 oder 4-1BB, die der Signalverstärkung dienen und sowohl Potenz als auch Persistenz der CAR-T-Zellen verbessern [15, 17, 18].

Die extrazelluläre scFv-Domäne kann für quasi jedes tumorassoziierte Antigen (= Target) generiert werden und ist nicht MHC-I-abhängig. Die durch den synthetischen CAR eingeleitete intrazelluläre Signalkaskade entspricht der des TCR und löst somit T-Zell-Effektorfunktionen aus, also die gezielte Lyse der Tumorzelle durch die CAR-exprimierende T-Zelle (CAR-T-Zelle) [14].

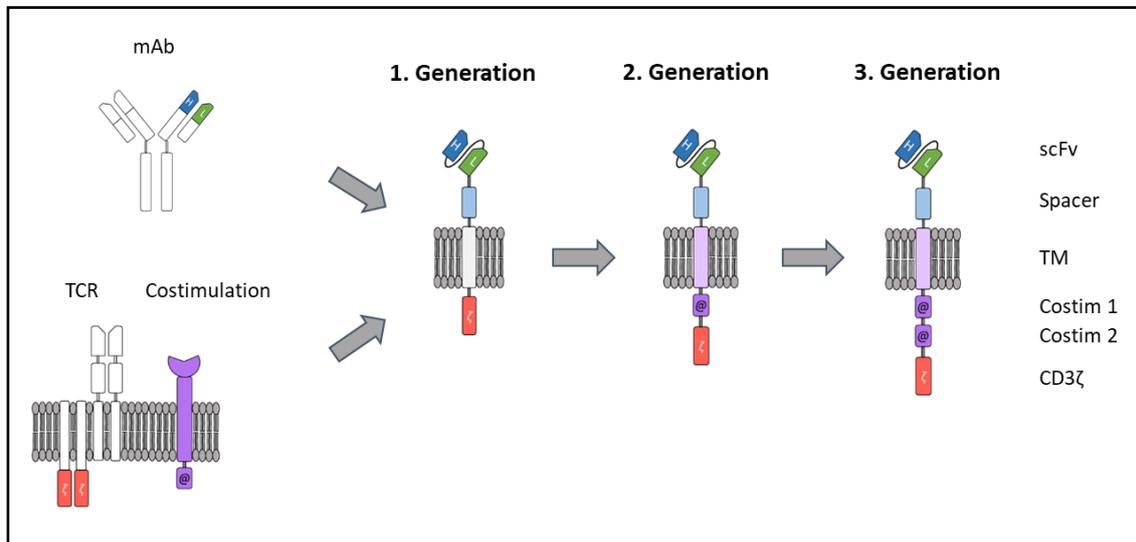


Abb. I-5 Aufbau des CAR

Der CAR (chimeric antigen receptor) setzt sich aus den variablen Anteilen der schweren und leichten Ketten eines mAb, einem extrazellulären Spacer, einer Transmembrandomäne (TM) zur Signalweiterleitung, einer vom TCR abgeleiteten CD3ζ(zeta)-Domäne für die Einleitung der intrazellulären Signalkaskade sowie – je nach Generation des CAR – einer oder zwei intrazellulären costimulatorischen Domänen zur Signalverstärkung zusammen.

3.2 Herausforderungen der CAR-T-Zell-Forschung

Als Resultat der überzeugenden klinischen Effektivität wurden bislang erfolgreich zwei ‚Off-the-shelf‘-CAR-Produkte auf den Markt gebracht und im Jahr 2017 in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) für die klinische Anwendung zugelassen. Hierbei handelt es sich um Kymriah (Tisagenlecleucel) und Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel), die für die Behandlung der B-ALL bzw. des DLBCL (Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms) anerkannt wurden. Das Antigen, gegen das sich beide Produkte richten, ist CD19 (vgl. Kapitel I.1.4) [19, 20].

Die CD19-CAR-T-Zell-Produkte haben die Behandlung von intensiv vorbehandelten Patienten mit rezidivierenden oder therapierefraktären malignen B-Zell-Erkrankungen revolutioniert. In klinischen Studien wurde in 70 bis über 90% dieser zuvor prognostisch schlechten Fälle eine komplette Remission erreicht. Die spektakulären Ergebnisse dürfen nicht vergessen lassen, dass eine Therapie mit konventionellen CAR-T-Zellen auch mit beträchtlichen Sicherheitsrisiken einhergeht. Sobald die Zellen reinfundiert werden, entziehen sie sich jedweder Kontrolle von außen – sie bewegen sich aktiv zum Ort des Geschehens, tragen zu einer komplexen Immunantwort bei und besitzen die Fähigkeit, sich zu erneuern und zu expandieren [14, 21].

So kann es zu starken Nebenwirkungen kommen, am häufigsten zum sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndrom (engl. cytokine release syndrome, CRS), das durch eine erhöhte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, also Entzündungsmediatoren, gekennzeichnet ist. Vor allem IL-6 spielt hierbei eine große Rolle. Dies führt u. a. zu Symptomen wie hohem Fieber, Müdigkeit, Myalgien, Tachykardie, Hypotension, kardialer Dysfunktion, Nierenschädigung und Leberversagen. Ein CRS kann mit Tocilizumab, einem gegen IL-6 gerichteten Antikörper, behandelt werden [23].

Neurotoxizität ist eine weitere Problematik der CAR-T-Zell-Therapie, wobei es klinisch zu Delir, Verwirrung, Myoklonien, Aphasie und Anfällen kommen kann. Die Ursache dieser meist reversiblen Symptomatik ist bislang unklar. Eine wichtige Herausforderung stellt außerdem die sogenannte On-Target-Off-Tumor-Toxizität

dar. Die meisten tumorassoziierten Antigene, die von CAR-T-Zellen als Targets angesteuert werden, werden nicht nur vom Tumor, sondern auch von gesunden Geweben im Körper exprimiert. Beispielsweise hatte die ErbB2-CAR-T-Zell-Therapie letale Folgen aufgrund der zuvor unbekannt niedrigen Expression im Lungengewebe. Zudem kommt es nach der Behandlung mit CD19-CAR-T-Zellen zur vollständigen B-Zell-Aplasie; ohne B-Zellen kann der Körper keine Antikörper mehr produzieren. Die daraus resultierende Immunsuppression kann allerdings durch Immunglobulin-Substitution ausgeglichen werden [24, 25].

3.3 Antigenverlust als Problematik der Immuntherapie

Der Erfolg der gezielten Immuntherapien (vgl. Kapitel I.2.2, I.3.3), zu denen auch die CAR-Therapie gehört, beruht auf der Expression des Target-Antigens durch die Tumorzelle. Folglich droht, sobald diese Zielstruktur für die CAR-T-Zellen nicht mehr vorhanden ist, ein Therapieversagen. Mit jeder durchgeführten Immuntherapie steigt das Risiko eines Antigenverlusts [21].

Das Phänomen des Antigenverlusts von Tumorzellen bedroht die Effizienz der CAR-T-Zellen und stellt eines der größten Probleme der gezielten Immuntherapien dar. In klinischen Studien wurden sowohl bei pädiatrischen als auch adulten Patienten Rezidivraten von 14 bis zu 49 % im Follow-Up beobachtet. Diese therapierefraktären Patienten haben bislang eine sehr schlechte Prognose. Die Tatsache, dass Antigenverlust auch nach der Behandlung mit Blinatumomab, dem bispezifischen CD3/CD19-mAb, vorkommt, lässt vermuten, dass durch die singuläre Therapie auf CD19 ein Selektionsdruck entsteht. Tumorzellen mit Genmutationen, die Auswirkungen auf die Form des CD19-Antigens haben, werden selektiert, sodass CAR-T-Zellen das Target nicht mehr erkennen können. Lösungsansätze hierfür sind u. a. die Suche nach neuen tumorassoziierten (oder besser, tumorspezifischen) Antigenen und das synchrone Targeting mehrerer Zielmoleküle [26, 27].

4. Adapter-CAR-T-Zellen (AdCAR)

Die Idee eines Adaptersystems ist es, die Aktivierung der T-Zelle funktionell von der Antigenerkennung zu trennen, also die Aktivität der CAR-T-Zellen steuerbar zu machen und damit die Therapiesicherheit und -flexibilität zu erhöhen. Hierfür werden antigenspezifische Adaptermoleküle, beispielsweise monoklonale Antikörper oder deren Fragmente, ‚zwischengeschaltet‘. Sie können so konstruiert werden, dass sie einerseits an das gewählte Tumorantigen binden, und andererseits mittels eines chemischen Markers von der CAR-T-Zelle erkannt werden können.

Diverse Arbeitsgruppen haben solche Adaptersysteme entwickelt, wobei bisher als Marker des Adaptermoleküls u. a. FITC (Anti-Fluorescein Isothiocyanat) oder eine Kombination aus Biotin und Avidin verwendet wurden. Die klinische Anwendung könnte allerdings dadurch verhindert werden, dass diese Marker durch körperfremde und damit höchst immunogene Bestandteile ein erhöhtes Sicherheitsrisiko bieten. Bei Adaptersystemen mit Avidin wurde *in vitro* keine ausreichende Lyse der Tumorzellen erreicht [29–31].

Im Adaptersystem unserer Arbeitsgruppe ist die T-Zell-Aktivierung und die Lyse der Tumorzelle das Ergebnis eines zweistufigen Prozesses. Im Gegensatz zum konventionellen CAR findet dabei die Zwischenschaltung eines Adaptermoleküls statt, das sowohl an die Adapter-CAR-T-Zelle (AdCAR-T-Zelle), als auch antigenspezifisch an die Zielzelle bindet. Die Antigenerkennung wird somit indirekt auf die AdCAR-T-Zelle übertragen, die aktiviert wird und folglich die Lyse der gebundenen Zelle einleitet (siehe *Abb. 1-6*).

Die Adaptermoleküle enthalten ein von Biotin abgeleitetes ‚Neo-Epitop‘, das Linker-Label-Epitop (LLE), das von der Anti-LLE-scFv-Domäne des AdCAR erkannt wird. Das LLE ist als Struktur, die körpereigenem Biotin sehr ähnlich ist, praktisch nicht immunogen, aber gleichzeitig spezifisch genug, um die alleinige Gegenstruktur zur AdCAR-T-Zelle zu bilden; diese bindet also kein körpereigenes Biotin. Antikörper, die das LLE tragen, werden im Folgenden biotinylierte Antikörper (bmAb) genannt. Sie können für praktisch jede beliebige Antigen-spezifität hergestellt werden.

Der AdCAR selbst enthält einen Bestandteil von IgG4 als Spacer, eine CD8-Transmembrandomäne, eine CD3 ζ (zeta)-Domäne als intrazelluläre Signaldomäne und 4-1BB als costimulatorische Domäne der zweiten Generation. Um die Expression des AdCAR in der Durchflusszytometrie zu ermöglichen, ohne den AdCAR selbst als Erkennungsmerkmal zu nutzen und somit durch Fluoreszenzmarker abzusättigen oder zu aktivieren, wird LNGFR coexprimiert. So wird sichergestellt, dass der AdCAR vor der eigentlichen Therapie unberührt bleibt und nicht in die Antigenerkennung eingegriffen wird [32].

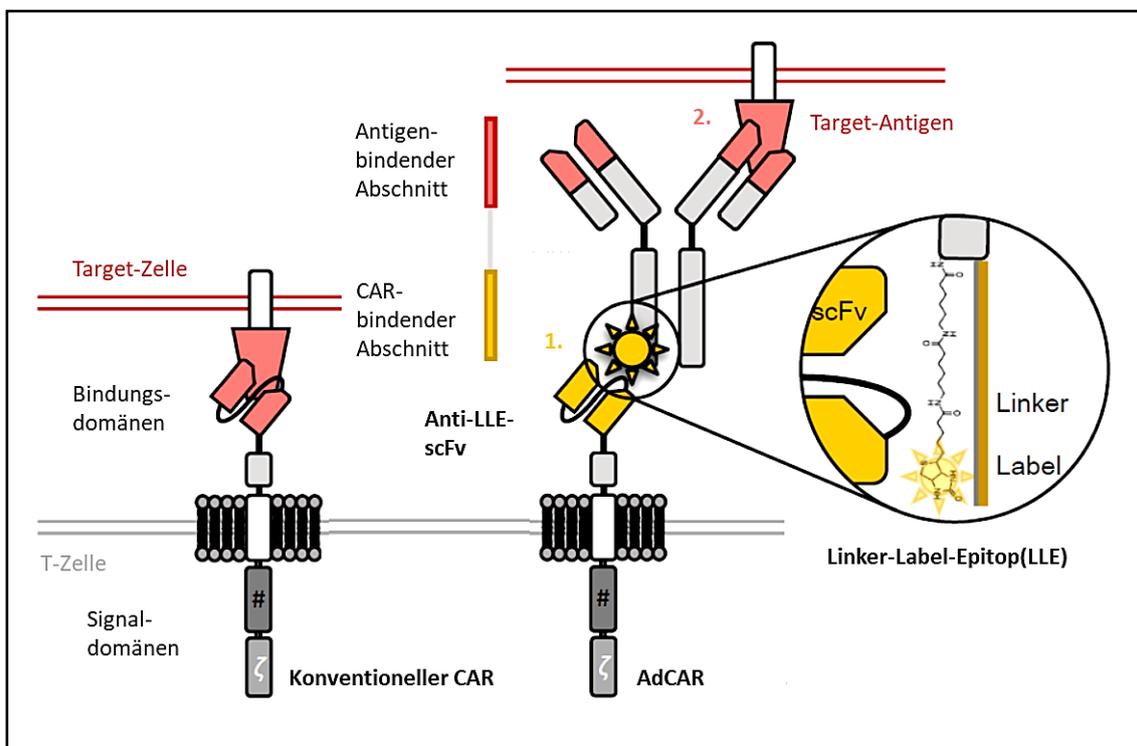


Abb. I-6 Aufbau des AdCAR

Das Target-Antigen wird vom konventionellen CAR direkt gebunden, während beim AdCAR ein Antikörper zwischengeschaltet ist, der spezifisch das Antigen erkennt (2). Das Linker-Label-Epitop (LLE) des Adaptermoleküls, ein Biotin-Derivat, wird von der Anti-LLE-scFv-Domäne des AdCAR erkannt (1). Die Signalweiterleitung geschieht durch eine CD8-Transmembrandomäne (weiß dargestellt), eine CD3 ζ (zeta)-Domäne sowie eine costimulatorische Domäne (#) der zweiten Generation, 4-1BB.

[Adaptiert aus dem Manuskript *Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*]

Die AdCAR-T-Zell-Therapie soll gegenüber der Therapie mit konventionellen CAR-T-Zellen folgende Vorteile bieten:

1. Steuerbarkeit: Im Falle einer Toxizität kann die Gabe der bmAbs sofort gestoppt werden. Antikörper werden schnell von der Leber abgebaut; die Wirkung der AdCAR-T-Zellen wird also ausgeschaltet, sobald keine bmAbs mehr gegeben werden (Antigen- und Antikörper-abhängige Lyse). Die AdCAR-T-Zellen persistieren im Körper, sind aber ohne Zugabe von bmAbs ‚normale‘ T-Zellen. Die Herstellung der bmAbs ist zügig und unkompliziert sowie theoretisch für jedes tumorassoziierte Antigen möglich.

2. Flexibilität: Im Falle eines Antigenverlusts bzw. eines Therapieversagens kann ein schneller Wechsel des bmAbs erfolgen (sequenzielles Targeting) und ein neues Target-Antigen gewählt werden. Statt eines Antikörperwechsels kann auch eine Kombination mehrerer verschiedener bmAbs gewählt werden (multiples synchrones Targeting). Die Antikörper stellen somit die flexible Komponente des Systems dar, während die AdCAR-T-Zellen unverändert bleiben.

3. Selektivität: Im Gegensatz zu konventionellen CAR-T-Zellen sind die bmAbs – und damit die Aktivität der AdCAR-T-Zellen – titrierbar. Folglich kann zur Prävention von toxischen Nebenwirkungen die Dosis langsam gesteigert werden oder von Beginn an eine Kombination verschiedener Antikörper in niedriger Konzentration erfolgen. So wird nur ein Effekt auf das Tumorgewebe erzielt und gesundes Körpergewebe geschont.

5. Zielsetzung dieser Arbeit

Konventionelle CAR-T-Zellen haben bislang eine überzeugende Wirkung gegen B-phänotypische Malignome, wie die Akute B-Zell-Leukämie, gezeigt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Vorteile der *Steuerbarkeit*, *Flexibilität* und *Selektivität* von AdCAR-T-Zellen gegenüber der konventionellen CAR-Therapie aufzuzeigen und diese als die drei Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie zu etablieren.

1. Steuerbarkeit: Zunächst soll *in vitro* die Funktion der AdCAR-T-Zellen geprüft werden. Exemplarisch wird hierzu das B-Zell-Lymphom JeKo-1 verwendet, das typische B-phänotypische Oberflächenmerkmale exprimiert. Es soll gezeigt werden, dass die Oberflächenantigene CD19, CD20 und ROR1 als Zielstrukturen für die AdCAR-T-Zellen geeignet sind und dass die AdCAR-T-Zellen antigen- und antikörperabhängig Tumorzellen lysieren, also nur dann, wenn der passende bmAb zum Zielantigen vorhanden ist.

2. Flexibilität: Der Situation des Antigenverlusts von Tumorzellen (Escape-Mechanismus) soll mithilfe der Knockout-Varianten von JeKo-1 simuliert werden. Es soll gezeigt werden, dass trotz des Wegfalls einer oder mehrerer Zielstrukturen, d. h. Target-Antigene, mit der AdCAR-T-Zell-Therapie noch erfolgreich behandelt und somit ein Therapieversagen durch Antigenverlust verhindert werden kann. Dabei sollen als Kombinationstherapien sequenzielles Targeting sowie multiples synchrones Targeting mit zwei oder mehr Antigenen getestet werden.

3. Selektivität: Zuletzt sollen die Schwellenkonzentrationen der Adaptermoleküle CD19, CD20 und ROR1 austitriert werden, um ein kombiniertes Targeting mit einer bmAb-Konzentration unterhalb der AdCAR-Aktivierungsschwelle erproben zu können. Die Wirkung der AdCAR-T-Zell-Therapie auf Tumorzellen soll durch deren multiple Expression von Zielantigenen gewährleistet bleiben und das Risiko der On-Target-Off-Tumor-Toxizität auf gesundes Gewebe minimiert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

| | |
|---|---|
| Brutschrank HERAcell | Heraeus (Hanau, D) |
| Sicherheitswerkbank HERAsafe | Heraeus (Hanau, D) |
| Zentrifugen: ROTINA 420R ROTANTA 46 RSC ROTIXA 50 RS | Hettich (Tuttlingen, D) Hettich (Tuttlingen, D) Hettich (Tuttlingen, D) |
| Mikroskope: Durchlichtmikroskop CX40 Inversionsmikroskop IX50 Inversionsmikroskop Wilovert | Olympus (Hamburg, D) Olympus (Hamburg, D) Will (Wetzlar, D) |
| Blutanalysegerät ABX Micros CRP 200 | Horiba (Kyoto, JPN) |
| ADVIA 120 Hämatologie-System | Siemens (Erlangen, D) |
| Biostore Stickstofftank -130 °C | Cryo Anlagenbau (Wilnsdorf, D) |
| Eismaschine | Scotsman (Vernon Hills, USA) |
| Kühlschrank 4 °C | Liebherr (Biberach a.d.R., D) |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr (Biberach a.d.R., D) |
| Gefrierschrank -80 °C 926 Ultra-Low Freezer Cryo | Forma Scientific (Marietta, USA) |
| Wasserbad, beheizbar | GFL (Burgwedel, D) Mettler (Schwabach, D) |
| Reagenzglasschüttler: REAX top Minishaker MS1 | Heidolph (Schwabach, D) IKA (Staufen, D) |

| | |
|--|---|
| Pipettierhilfe PIPETBOY acu | Integra Biosciences (Hudson, USA) |
| Mehrkanalpipette (12) 20-200 µl | HTL (Warschau, POL) |
| Pipetten: Pipetman 10/100/200/1000 µl Research 2,5/20 µl | Gilson (Middleton, USA) Eppendorf (Hamburg, D) |
| LSR II Flow Cytometer | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Victor 1420 Multilabel Counter | Perkin Elmer (Waltham, USA) |
| Mr. Frosty Gefrierbehälter (2 ml) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| QuadroMACS Separator | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |

1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| Pipettenspitzen: 20/200/1000 µl | Ratiolab (Dreieich, D) Sarstedt (Nürnbrecht, D) |
| Spritzen, steril: 1/2/5/10/20 ml 50 ml | Braun (Melsungen, D) BD Plastipak (Franklin Lakes, USA) |
| Einmalpipetten, Plastik, steril: Stripette 2/5/10/25/50 ml | Corning (Corning, USA) |
| Reaktionsgefäße, PP, 1,5 ml | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Kryoröhrchen, PP, steril, 2 ml | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| FACS-Röhrchen, Rundboden, PS, 5 ml | Corning (Corning, USA) |
| Falcon, PP, steril: 15/50 ml | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Zellkulturflaschen, steril: Cellstar 25/75/175 cm ² | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Zellkulturplatten, steril: 96-/48-/24-/12-/6-well | Corning (Corning, USA) |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Cellstar Mikroplatten, Flachboden, weiß, 96-well | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Costar Mikroplatten, Rundboden, durchsichtig, 96-well | Corning (Corning, USA) |
| Zellsieb, 40 µm | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Neubauer-Zählkammer | Hecht Assistent (Sondheim/Rhön, D) |
| Deckgläser | Menzel (Braunschweig, D) |
| Safety-Multifly Butterfly 23G, 200 mm | Sarstedt (Nürnbrecht, D) |
| Softasept Haut-Desinfektionsspray | Braun (Melsungen, D) |
| Descosept Flächendesinfektionsspray | Dr. Schumacher (Malsfeld, D) |
| Aseptoman Händedesinfektionsmittel | Dr. Schumacher (Malsfeld, D) |

1.3 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---|---|
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| RPMI 1640 Medium | Biochrom (Berlin, D) |
| DMEM (High glucose + L-Glutamine) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Opti-MEM Reduced Serum Medium | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| TexMACS | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | WAK-Chemie Medical (Steinbach, D) |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Biocoll Separating Solution | Biochrom (Berlin, D) |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Heparin-Natrium 25 000 | Ratiopharm (Ulm, D) |
| L-Glutamin 200 mM | Biochrom (Berlin, D) |
| Penicillin 10 000 U/ml + Streptomycin 10 000 µg/ml | Biochrom (Berlin, D) |

| | |
|---------------------------------------|---|
| CliniMACS PBS/EDTA Buffer | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BD CompBeads Ig, κ + Negative control | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Lipofectamine 3000 Reagent | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Lenti-X Concentrator | Clontech (Mountain View, USA) |

1.4 Antikörper und Zytokine

Primäre und sekundäre Antikörper

| | |
|---------------------------------|--|
| CD3-VioBlue, BW264/56 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD8-APC-Vio770, BW135/80 | |
| CD19-APC, REA675 | |
| CD20-PE, REA780 | |
| CD271 (LNGFR)-FITC, ME20.4-1.H4 | |
| Anti-Biotin-FITC | |
| Anti-Biotin-APC | |
| CD4-BUV395, SK3 | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |

Biotinylierte Antikörper

| | |
|-------------------------------|--|
| CD3-Biotin (bCD3), REA613 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD19-Biotin (bCD19), REA675 | |
| CD20-Biotin (bCD20), REA780 | |
| CD22-Biotin (bCD22), REA340 | |
| CD79b-Biotin (bCD79b), REA120 | |
| CD276-Biotin (bCD276), FM276 | |
| Anti-ROR1-Biotin (bROR1), 2A2 | |
| REA Control-Biotin (bControl) | |

Sonstiges

| | |
|----------------------------|--|
| Human IL-7, premium grade | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Human IL-15, premium grade | |
| CD4 MicroBeads, human | |
| CD8 MicroBeads, human | |
| T Cell TransAct, human | |

1.5 Zellmaterial und Medien

Zellmaterial

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| JeKo-1 wild type | Miltenyi Biotec GmbH |
| JeKo-1 CD19KO | |
| JeKo-1 CD20KO | |
| JeKo-1 CD19KO/CD20KO | |
| HEK-293T | Clontech (Mountain View, USA) |
| T-Zellen aus peripherem Vollblut | Freiwillige, gesunde Spender |

Medien

| | |
|-----------------------------|--|
| JeKo-1 (Luc-GFP) | 500 ml RPMI-Medium + 100 ml FCS (20 %) + 5 ml Penicillin/Streptomycin + 5 ml L-Glutamin |
| T-Zellen und AdCAR-T-Zellen | TexMACS Medium 200 ml + 2 ml Penicillin/Streptomycin + 200 µl IL-7 (10 µg/ml) + 100 µl IL-15 (10 µg/ml) |
| HEK-293T | 500 ml DMEM (High Glc + L-Glutamine) + 50 ml FCS (10 %) |

2. Methoden

Im Zuge dieser Arbeit wurde mit der käuflichen Zelllinie JeKo-1 (B-Mantelzell-Lymphom) sowie dem Vollblut dreier gesunder Spender gearbeitet. Ein Ethikvotum liegt vor: 761/2015B02.

2.1 Zellkultur

Zellpflege

Sämtliche Zellkulturen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, waren Suspensions-Zelllinien. Deren Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C Lufttemperatur, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Hierzu wurden, je nach Volumen, Zellkulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² verwendet.

Bei der Pflege der Zelllinie JeKo-1 wurde zunächst die Zelldichte mit dem Inversionsmikroskop beurteilt. Bei einer Erniedrigung des pH-Wertes erfolgte eine Farbänderung des Mediums von Rot nach Gelb. Eine genaue Bestimmung der Zellzahl konnte mittels Neubauer-Zählkammer, ADVIA 120 oder ABX Micros CRP 200 erfolgen. Außerdem wurde nach Färbung mit Trypanblau eine Einschätzung der Zellvitalität und Zellmorphologie vorgenommen. Anschließend fand eine Einstellung der Zelldichte auf circa 0,5 x 10⁶ Zellen pro ml statt, indem das Volumen mit der gewünschten Zellzahl erhalten und mit einer entsprechenden Menge Zellkultur-Medium aufgefüllt wurde (circa 1:3-Splittung). Die beschriebenen Schritte wurden alle zwei bis drei Tage durchgeführt und richteten sich nach der Empfehlung der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH. Die Pflege der AdCAR-T-Zellen verlief analog, allerdings erfolgte eine Einstellung der Zelldichte auf 1 x 10⁶ Zellen pro ml.

Als Kulturmedium wurde für die JeKo-1-Zelllinie RPMI-Medium mit 20 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet. Die AdCAR-T-Zellen wurden in TexMACS Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 0,1 % IL-7 und 0,05 % IL-15 kultiviert.

Einfrieren und Auftauen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurde in einem ersten Schritt das Einfriermedium vorbereitet. Dieses bestand zu 90 % aus FCS und zu 10 % aus DMSO. Pro Kryotube wurden 1,5 ml Einfriermedium benötigt, die Zellzahl pro Kryotube betrug bei der JeKo-1-Zelllinie zwischen 1×10^7 und 3×10^7 und bei AdCAR-T-Zellen zwischen $2,5$ und 5×10^7 Zellen.

Die einzufrierende Menge an Zellen wurde aus der Zellkultur entnommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur, 250g, 9/R9 abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet schnell, aber vorsichtig, in Einfriermedium resuspendiert. Nach Verteilung des Volumens auf die Kryotubes wurden diese in einer Mr. Frosty Einfrierhilfe zügig in einen Gefrierschrank mit $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryotubes so lange in ein Wasserbad mit $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten, bis sich nahezu alle Eiskristalle aufgelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen in einen 50 ml-Falcon mit vorgewärmtem Zellmedium pipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur, 300g, 9/R9 zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die JeKo-1-Zelllinie wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt, die AdCAR-T-Zellen auf 2×10^6 Zellen pro ml.

2.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Hintergrund

Das Prinzip der Durchflusszytometrie bzw. des FACS (fluorescence activated cell sorting) ist die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Bestandteilen. Auf Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern können Zellantigene bestimmt und so eine umfassende immunologische Phänotypisierung durchgeführt werden.

Durch hydrodynamische Fokussierung, d. h. Aufnahme der Zellsuspension in eine schmale Messkapillare mittels Überdruck, werden die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und quantifiziert. Aus der Streuung des Laserlichts durch die Zellen lassen sich deren Eigenschaften erschließen: Mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC = forward light scatter) kann die Zellgröße und mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward light scatter) die Zellgranulierung bestimmt werden. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch das Laserlicht angeregt, auf ein höheres Energieniveau angehoben und geben die Energie anschließend wieder ab, wenn sie auf ihr früheres Energieniveau zurückfallen. Diese Energie wird in Form von Photonen emittiert, die vom Durchflusszytometer detektiert werden. Anschließend setzt das Gerät die Signale in eine graphische Darstellung um (siehe *Abb. II-1*). Da sich die Emissionsmaxima verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden, ist es möglich, mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachzuweisen. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und lässt eine quantitative Analyse der Antigenexpression zu. Als Kontrolle ist immer eine ungefärbte Zellprobe nötig, da Zellen an sich bereits eine unspezifische Autofluoreszenz besitzen und nur so abgegrenzt werden kann, ab wann eine Fluoreszenzintensität – und damit die entsprechende Antigenexpression – tatsächlich als positiv gilt [33, 34].

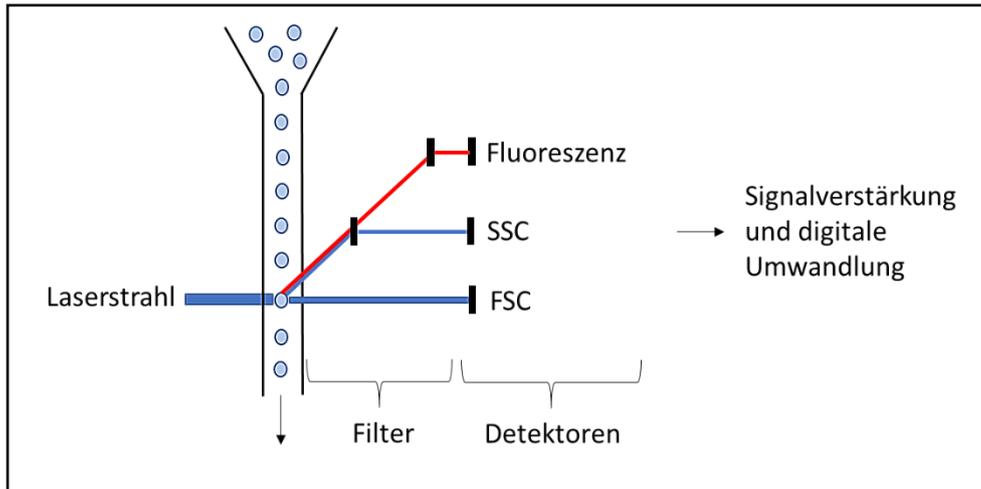


Abb. II-1 Funktionsweise des Durchflusszytometers

Zellen durchlaufen einzeln eine Messkapillare und werden vom Laserlicht angeregt. Mithilfe der Streueffekte FSC (forward light scatter) und SSC (sideward light scatter) können Größe und Granulierung der Zellen bestimmt werden. Je nach konjugiertem fluoreszenzmarkiertem Antikörper gibt die Zelle die durch das Laserlicht aufgenommene Energie wieder ab, die vom Gerät detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden kann.

Durchführung

Im Folgenden wird die FACS-Sekundärfärbung mit Biotin-Antikörpern beschrieben. Im Falle von Primärfärbungen entfiel der erste Färbeschritt. Die Zentrifugation (Waschen) erfolgte stets bei 4 °C, 9/R7, 400g, für 5 Minuten.

Pro FACS-Tube wurde eine Zellzahl von 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen gewählt und mit 2ml MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde dann durch schnelles Invertieren und Abtupfen auf saugfähigem Papier möglichst ohne Restvolumen entfernt.

Der erste Färbeschritt erfolgte mit dem Biotin-Antikörper des entsprechenden Antigens (z. B. bCD22). Hiervon wurden 5 µl auf das Zellpellet im FACS-Tube pipettiert und anschließend durch leichtes Anschnipsen des FACS-Tubes gemischt. Die Inkubation wurde im Kühlschrank für 15 Minuten oder bei Raumtemperatur im dunklen Schrank für 10 Minuten durchgeführt. Nach Zugabe von 2 ml MACS-Puffer wurden die Zellen abzentrifugiert.

Dann erfolgte der zweite Färbeschritt, indem 5µl des sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers (z. B. Anti-Biotin-APC) zugegeben wurden. Im Falle einer reinen Primärfärbung war hier eine Kombination mehrerer Antikörper möglich (z. B. CD19-APC und CD20-PE). Nun wurden eine erneute Inkubation und anschließend ein Waschschrift mit 2 ml MACS-Puffer durchgeführt.

Bis kurz vor der Messung wurden die gefärbten Zellen unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt. Wenn eine Unterscheidung lebender und toter Zellen (Lebend-Tot-Färbung) nötig war, erfolgte circa 5 Minuten vor der Messung eine Zugabe von 2 µl Propidium Iodid (PI).

Die Messung wurde an einem BD™ LSR II Flow Cytometer durchgeführt. Die Einstellung der Spannungen FSC und SSC wurde so gewählt, dass die gesamte Zellpopulation gut sichtbar war und nicht durch die Achsen geschnitten wurde. Aus den Populationen konnten einzelne Ausschnitte als Gates bestimmt und in einem weiteren Diagramm ausgewertet werden.

Die FACS-Daten wurden als fcs-Files exportiert und mit der Software FlowJo 10.4 analysiert, auf der sämtliche FACS-Graphiken dieser Arbeit beruhen.

2.3 Herstellung des lentiviralen Vektors

Hintergrund

HIV-1-basierte lentivirale Vektoren sind ein effizientes Mittel, um Gene in das Genom teilungs- und nicht-teilungsfähiger Zellen zu integrieren. Innerhalb der Familie der Retroviren bilden die Lentiviren eine Gattung mit neun Stämmen, zu denen u. a. der HI-Virus 1 gehört. Alle Retroviren besitzen zwei identische RNA-Einzelstränge positiver Polarität sowie eine Reverse Transkriptase, mit deren Hilfe das Virusgenom in doppelsträngige DNA transkribiert wird, die anschließend in das Genom der Zelle eingebaut werden kann. Sie bestehen aus einem komplexen Kapsid, das die RNA enthält. Das Kapsid ist von einer Lipidmembran umgeben, die virale Hüllproteine trägt. Das Genom setzt sich neben diversen nicht-codierenden und regulatorischen Abschnitten aus den Struktur- und Enzymgenen *gag* und *pol* zusammen, die entscheidend für den Lebenszyklus der Retroviren sind. *Gag* codiert hierbei für die Strukturproteine der Matrix und des Kapsids, *pol* für die Virale Protease, Reverse Transkriptase und die Integrase.

Seit deren Entwicklung 1989 haben lentivirale Vektoren viele Veränderungen durchlaufen, die zur Erschaffung nicht-replikationsfähiger und damit ungefährlicherer Viren führten, mit denen Zellen im wissenschaftlichen und klinischen Kontext transduziert werden können. Außerdem fand man heraus, dass das Ersetzen der retroviralen Hüllproteine durch VSV-G-Hüllproteine (Vesicular stomatitis virus) in weitem Tropismus, höherer Expression und besserer Genstabilität resultiert. HEK-293 (human embryonic kidney) ist die meistverwendete Zelllinie zur Produktion der lentiviralen Vektoren [35].

Durchführung

Die lentiviralen Vektoren waren in diesem Projekt nötig, um das AdCAR-Gen in T-Zellen stabil exprimieren zu können. Der genaue Ablauf der AdCAR-T-Zell-Herstellung wird im nächsten Kapitel ausgeführt.

Das Protokoll zur Virenherstellung wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec GmbH erstellt und soll vertraulich behandelt werden, weshalb im Folgenden die Durchführung nur knapp beschrieben wird. Die Aufkonzentrierung mit Lenti-X Concentrator richtet sich nach dem Protokoll von Clontech Inc.

Am Tag vor der Transfektion (circa 20 Stunden) erfolgte die Aussaat von $1,75 \times 10^7$ HEK-293T in 175 cm²-Flaschen in 20 ml Zellmedium, das aus DMEM (High glucose + L-Glutamine) mit 10 % FCS bestand.

Bei der Transfektion sollten die Zellen 75-90 % konfluent sein. Im ersten Schritt wurden eine DNA-Lösung aus Opti-MEM und drei Plasmiden (VSV-G, *gag/pol*, Transfervektorplasmid) sowie eine Opti-MEM-Lipofectamine-Lösung hergestellt. Anschließend wurden die beiden Lösungen vermischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit konnte das Zellmedium von der HEK-293T-Kultur entfernt und durch 20 ml frisches DMEM (ohne Zusätze) ersetzt werden. Die Lösung aus Plasmiden, Lipofectamine und Opti-MEM wurde nun tropfenweise in das frische Zellmedium eingebracht.

Nach 4-6 Stunden wurden 2,5 ml FCS hinzugefügt. Die Virenernte erfolgte nach circa 48 und 72 Stunden. Hierbei wurde das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen gesammelt und einmal abzentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen (4 °C, 9/R0, 500g, 10 Minuten). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit 4-°C-kaltem Lenti-X Concentrator gemischt, wobei die Menge des Lenti-X Concentrators circa ein Drittel des Überstands betragen sollte. Nach Inkubation über Nacht wurde die Mischung zentrifugiert (4 °C, 9/R0, 1500g, 45 Minuten). Anschließend konnte das entstandene weiße Viruspellet vorsichtig von dem Überstand befreit werden. Nun wurde mit PBS (circa 10 % des Ursprungsvolumens) resuspendiert. Die Aufbewahrung der lentiviralen Vektoren erfolgte in 50 µl-Aliquots bei -80°C.

2.4 Herstellung von AdCAR-T-Zellen

Die Herstellung von AdCAR-T-Zellen (AdCAR = adapter chimeric antigen receptor) geschah nach dem folgenden zeitlichen Ablauf und wird den nächsten Kapiteln ausführlich beschrieben.

Tag 0

PBMC-Isolierung

Separation der CD8- und CD4-T-Zellen mit MACS-Technologie

Stimulation der T-Zellen



Tag 1

Virale Transduktion



Tag 3

TransAct-Verdünnung



Tag 4

Überführung in Zellkulturflaschen



Tag 7

LNGFR-Expressions-FACS

2.4.1 PBMC-Isolierung

Hintergrund

Die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), die bei der Herstellung von AdCAR-T-Zellen zum Einsatz kamen, wurden aus heparinisiertem Vollblut freiwilliger, gesunder Spender (männlich, 30 bis 40 Jahre alt) isoliert. Durch eine Zentrifugation mit Biocoll, einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml, wird ein Dichtegradient geschaffen. Dadurch können die verschiedenen Blutbestandteile nach ihren Dichteigenschaften aufgetrennt werden [36].

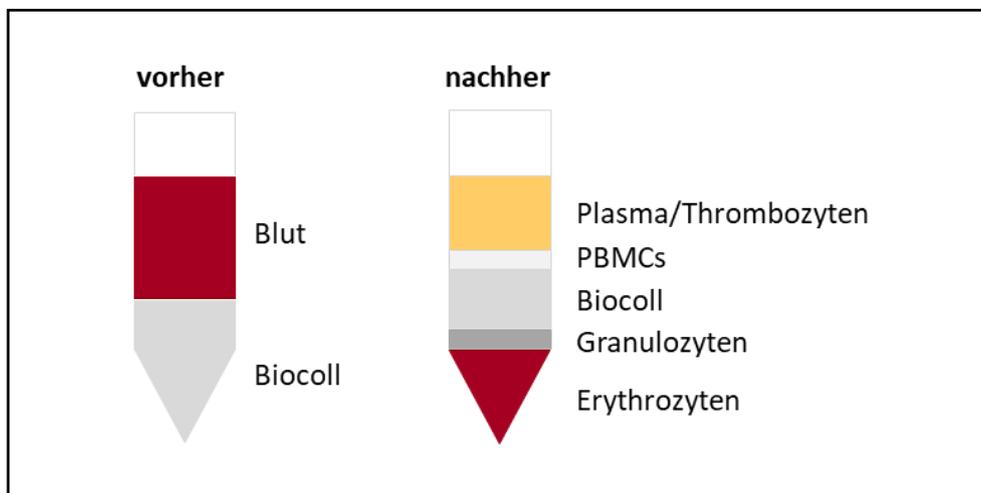


Abb. II-2 Auftrennung der Blutbestandteile

Bei der Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund der höheren Dichte unter dem Biocoll (1,077 g/ml), direkt darauf bildet sich der PBMC-Ring und als oberste Phase lagert sich thrombozytenreiches Plasma ab.

Hierbei sammeln sich Zellen mit höherer Dichte, also Erythrozyten und Granulozyten, unterhalb des Biocolls an. Zellen mit niedrigerer Dichte, also Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, sammeln sich oberhalb der Trennschicht an, wobei Lymphozyten und Monozyten als mononukleäre Zellen (PBMCs) einen schmalen Ring zwischen Biocoll und thrombozytenreicher Plasmaphase bilden [37].

Durchführung

Es wurde stets heparinisiertes Vollblut verwendet. Als vorläufige Hochrechnung galt: 1×10^6 PBMCs pro ml Blut, bestehend aus circa 50 % T-Zellen, hiervon wiederum circa $1/3$ CD8⁺ und $2/3$ CD4⁺.

An Tag 0 der AdCAR-Herstellung wurde zunächst in 50ml-Falcons 20 ml Biocoll vorgelegt. Anschließend wurde das Vollblut im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig darüber geschichtet, sodass zwei Phasen entstanden. Bei der nun folgenden Zentrifugation (20 °C, 1/R1, 800g, 30 Minuten) trennte sich das Blut nach deren Dichte in seine Bestandteile auf (siehe *Abb. II-2*).

Die PBMC-Schicht wurde mit einer 25 ml-Stripette von der Biocoll-Schicht aspiriert und in einem 50 ml-Falcon zweimal mit PBS gewaschen (20 °C, 9/R9, 500g bzw. 400g, 10 Minuten). Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 10 ml PBS pro 100 ml Vollblut aufgenommen und mit dem Hämatologie-System ADVIA 120 gezählt. Die Zellen wurden immer sofort weiterverarbeitet (siehe nächstes Kapitel).

2.4.2 Separation der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit MACS-Technologie

Hintergrund

MACS (magnetic activated cell sorting) ist ein Verfahren zur Separation bestimmter Populationen aus Zellgemischen anhand der Markierung spezifischer Antigene. Durch die Inkubation mit circa 50 nm-großen Magnet-Antikörper-Partikeln (MicroBeads) kann die Zellpopulation markiert werden, die separiert werden soll (= Labeling). Durchläuft das Zellgemisch anschließend eine Säule, die von einem Magnetfeld umgeben ist, bleiben die gelabelten Zellen in der Säule hängen, während alle anderen Zellen die Säule durchlaufen können (siehe *Abb. II-3*).

Ist die markierte Zellpopulation die gewünschte, kann diese durch Spülen der Säule gewonnen werden, d. h. es folgt eine positive Selektion. Möchte man allerdings nur die übrigen Zellen weiterverwenden und die Säule verwerfen, spricht man von

Depletion. Die Magnet-Antikörper-Partikel besitzen eine Polysaccharid-Hülle, an die der Antikörper gebunden ist. Diese zersetzt sich nach einigen Tagen, wodurch sich die Partikel von den Zellen lösen [38].

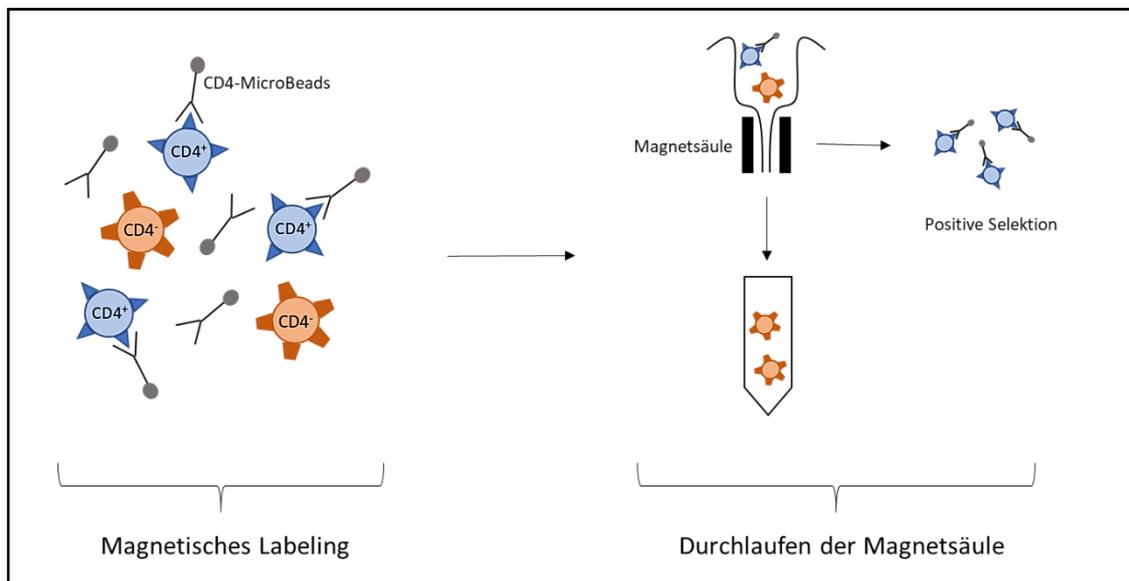


Abb. II-3 Prinzip der Zellseparation mit MACS-Technologie

Im Schema ist beispielhaft die Inkubation eines Zellgemisches mit CD4-MicroBeads dargestellt. Die CD4⁺-Zellpopulation wird so magnetisch markiert (= Labeling) und bleibt beim Durchlaufen einer Magnetsäule an dieser hängen, während der Rest des Zellgemisches ungehindert hindurchwandert und aufgefangen wird. Werden die Zellen aus der Säule ausgespült und behalten, spricht man von positiver Selektion.

Durchführung

Die Zellseparation mittels MACS-Technologie richtete sich mit leichten Änderungen nach dem Datenblatt von Miltenyi Biotec GmbH für CD8- und CD4-MicroBeads und wurde ebenfalls an Tag 0 durchgeführt.

Nach dem Zählen der frisch isolierten PBMCs (siehe voriges Kapitel) wurde die Zellsuspension bei 4 °C, 250g, 9/R7 für 10 Minuten zentrifugiert; der Überstand wurde komplett entfernt. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 80 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen wurden 20 µl CD8-MicroBeads pro 10⁷ Zellen

zugegeben und gut durchgemischt. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 2-8 °C. Nun wurden die Zellen gewaschen, d. h. nach Zugabe von 1,5 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen erneut bei 4 °C, 250g, 9/R7 für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands erfolgte eine Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml MACS-Puffer (bis 10^8 PBMCs).

Nach dem Platzieren der Magnetsäule (LS-Column) im Magnetfeld des QuadroMACS-Separators wurde diese mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml MACS-Puffer nachgewaschen, wobei stets gewartet wurde, bis das Volumen durchgelaufen war, allerdings ohne die Säule austrocknen zu lassen. Das gesamte Durchlaufvolumen wurde unterhalb der Säule in einem 50 ml-Falcon aufgefangen. Am Ende wurden 5 ml MACS-Puffer in die Säule pipettiert. Nach der vorsichtigen Entfernung aus dem Magnetfeld konnten die CD8-markierten Zellen mit dem zugehörigen Stempel aus der Säule in einen 50 ml-Falcon gespült werden. Nun erfolgte eine dreimalige Waschung mit gekühltem RPMI-Medium (ohne Zusätze) bei 4 °C, 250g, 9/R7 für je 10 Minuten.

Die unter der Säule aufgefangene Zellsuspension wurde anschließend nach dem exakt gleichen Protokoll wie eben beschrieben mit CD4-MicroBeads positiv selektioniert; die übrigen Zellen wurden verworfen.

Nach dem Waschen wurden die CD8⁺- und CD4⁺-T-Zell-Fraktionen jeweils in circa 10 ml 37 °C-warmem TexMACS-Medium mit den Zusätzen Penicillin/Streptomycin, IL-7 und IL-15 (vgl. Kapitel II.1.5) aufgenommen und mit dem ADVIA 120 gezählt.

2.4.3 Stimulation der T-Zellen

Als letzter Schritt der AdCAR-Herstellung an Tag 0 wurden die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen jeweils auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt, indem das entsprechende Volumen TexMACS-Medium mit Zusätzen in den 50 ml-Falcon dazugegeben wurde. In einer 24-Well-Platte wurden nun je 1 ml der CD8⁺ und CD4⁺

Zellen zusammengeführt, d. h. 2 ml Endvolumen mit je 50 % CD8⁺ und CD4⁺ Zellen pro Well. Entsprechend des TransAct-Datenblatts von Miltenyi Biotec GmbH wurden die T-Zellen mit 20 µl TransAct stimuliert.

2.4.4 Weitere Schritte der AdCAR-T-Zell-Herstellung

Virale Transduktion (Tag 1)

Zunächst wurde vorsichtig von jedem einzelnen Well 1 ml TexMACS-Medium abgenommen, ohne die Zellen am Boden der Wells zu aspirieren. Anschließend wurden 10 µl des Virusüberstands (zur Herstellung vgl. Kapitel II.2.3) auf die Zellen gegeben und es folgte eine Zentrifugation der 24-Well-Platte bei 32 °C, 800g, 9/R0, für 30 Minuten. Bei jeder Expansion wurde ein Well als Kontrolle nicht transduziert, d. h. als ‚Mock-T-Zellen‘ belassen.

TransAct-Verdünnung (Tag 3)

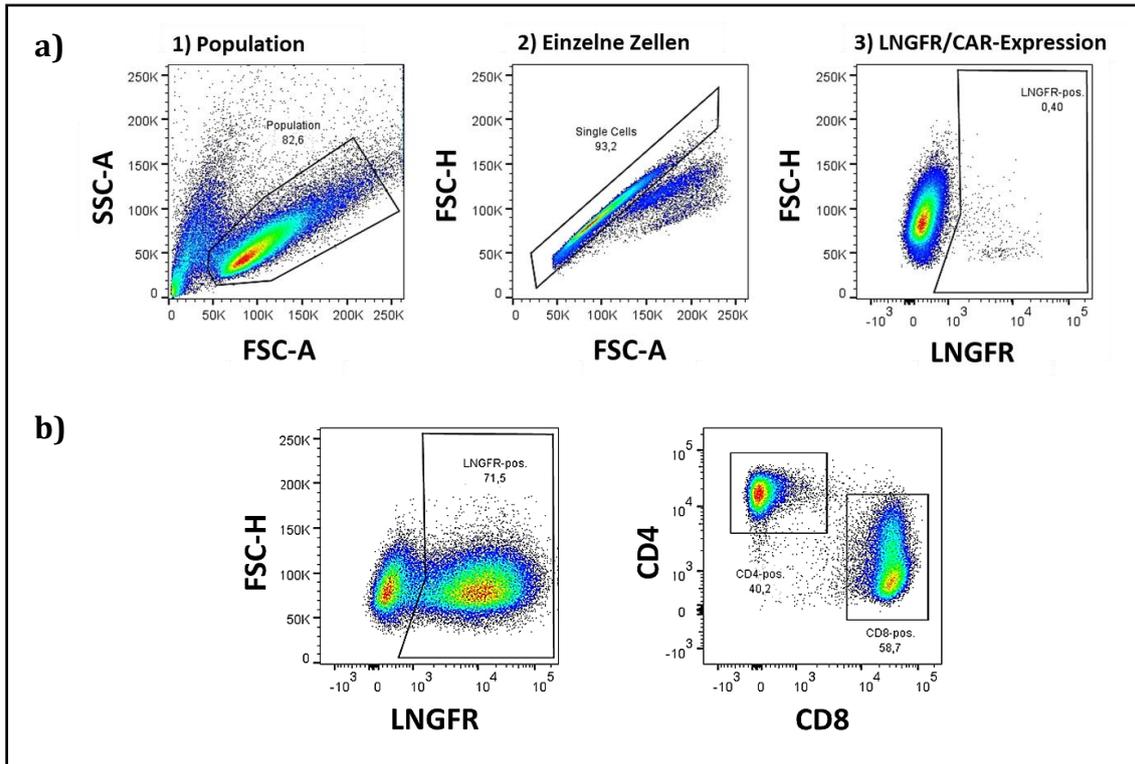
Zur Verdünnung des TransActs wurden weitere 0,5 ml pro Well entnommen und mit je 2 ml frischem TexMACS-Medium mit Zusätzen aufgefüllt.

Überführung in Zellkulturflaschen (Tag 4)

Zuerst wurde wieder jeweils 1ml des Mediums pro Well abgenommen. Nach der Resuspendierung der Zellen erfolgte eine Überführung der Zellen in Zellkulturflaschen und eine Verdreifachung des ursprünglichen Volumens, d. h. pro Well wurden circa 6 ml frisches TexMACS-Medium hinzugefügt.

LNGFR-Expressions-FACS (Tag 7)

Es erfolgte eine Überprüfung der CAR-Expression durch eine FACS-Analyse des Reporter-Antigens LNGFR. Die FACS-Färbung wurde anhand des in Kapitel II.2.2 beschriebenen Prinzips durchgeführt, wobei die Färbung mit einem Mastermix aus 5 µl LNGFR-FITC, 5 µl CD8-APC-Vio770 und 3 µl CD4-BUV395 geschah.



**Abb. II-4 a) Gating-Strategie anhand der Mock-T-Zellen
b) LNGFR-Expression der transduzierten T-Zellen mit CD4/CD8-Verteilung**

a) Die Gating-Strategie bestand aus der Selektion der T-Zell-Population, in der wiederum die Einzelzellen markiert wurden. Anschließend wurde die Population (Mock-T-Zellen) als Negativkontrolle festgelegt.

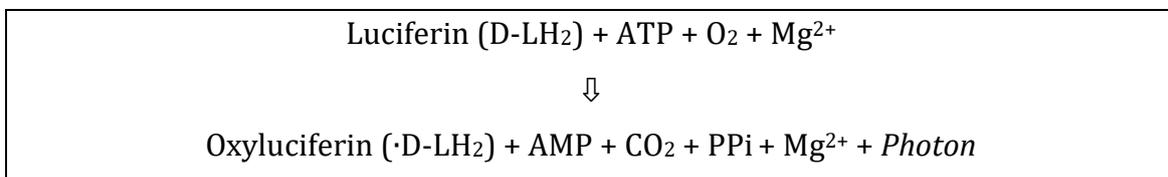
b) Die Messung der transduzierten Zellen erfolgte im selben Gate, wodurch die LNGFR-Expression (und damit die AdCAR-Expression) der Zellkultur abgelesen werden konnte: in diesem Fall 71,5 %. In der CD4/CD8-Verteilung zeigte sich ein Verhältnis von 40,2 % zu 58,7 %.

Es wurde je ein FACS-Tube ‚Unstained-Kontrolle‘, ‚Mock-T-Zellen‘ und ‚AdCAR-T-Zellen‘ analysiert. Aus der Co-Expression mit LNGFR ließ sich die CAR-Expression erschließen, die je nach verwendetem Virusüberstand circa 50 % bis 80 % betrug. Das Gating wurde anhand der Mock-T-Zellen (Stained-Kontrolle) durchgeführt, um positive LNGFR-Expression von unspezifischer Fluoreszenz abgrenzen zu können (siehe *Abb. II-4*).

2.5 Luciferase-basierter Kill-Assay

Hintergrund

Luciferasen sind natürlich vorkommende Enzyme, die eine Reaktion katalysieren, durch die sichtbares Licht entsteht (Biolumineszenz). Das Luciferase-Gen von *Photinus pyralis*, einem nordamerikanischen Leuchtkäfer, ist gut erforscht und kann, z. B. mit GFP (green fluorescent protein) als Reporter gen, mittels viraler Transduktion in Säugerzellen eingebracht werden. Für die Reaktion werden das Substrat des Enzyms, D-Luciferin (D-LH₂), ATP und Sauerstoff benötigt; außerdem ist Magnesium beteiligt. Es entstehen Oxyluciferin, Kohlenstoffdioxid, AMP und anorganisches Pyrophosphat. Die bei der Reaktion freiwerdende Energie wird von Oxyluciferin als Licht emittiert. Die durch die oxidative Decarboxylierung von Luciferin entstehende Lichtemission ist als gelb-grünes Licht bei 550–570nm im Luminometer messbar [39].



Die gemessene Lichtstärke („Counts“) ist proportional zur Luciferase-Aktivität. Diese ist wiederum abhängig von der Zahl der Luciferase-enthaltenden Zellen, in diesem Fall also der Tumorzellen. So kann die Zellzahl im Verlauf des Versuchs beobachtet und eine prozentuale Lyse berechnet werden.

Durchführung

Der Versuch wurde stets in einer 96-Well-Platte (Flachboden) angesetzt, als Medium wurde das JeKo-1-Kulturmedium verwendet (vgl. Kapitel II.1.5). Das Endvolumen pro Well betrug je 200 µl.

Grundschema einer Platte:

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|--------------------|----|----|----------------|
| 100%-Kontrolle | | | | | | | | 100%-Kontrolle | | | 100%-Kontrolle |
| | | | | | | | | 75%-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | 50%-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | 25%-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | 10%-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | 0%-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | ohne-mAb-Kontrolle | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Auf die hier leer dargestellten Wells wurden je nach Versuch die verschiedenen Konditionen verteilt, die Grundzusammensetzung bestand aber stets aus je 50 µl Tumorzellen (JeKo-1-Variante), biotinyliertem Antikörper, AdCAR-T-Zellen sowie Luciferin, insgesamt also 200 µl. Bei den Kontrollen wurde die fehlende Komponente durch Medium ersetzt.

Im ersten Schritt wurden je 50 µl JeKo-1-Zellen (Target-Zellen) mit der Konzentration 1×10^6 Zellen pro ml in jedes Well pipettiert, sodass sich entsprechend der Luciferase-Aktivität der JeKo-1-Zellvarianten (vgl. Kapitel III.2.1) 50 000 Zellen in jedem Well befanden; die Abstufungen der Kontrollen 75 %, 50 %, 25 % und 10 % wurden vorher entsprechend mit Medium verdünnt, bei der 0 %-Kontrolle wurde reines Medium mit Luciferin in das Well gegeben. Diese Kontrollen wurden später zur Auswertung benötigt, um die stattgefunden Lyse aller Wells abschätzen zu können (siehe *Abb. II-5*).

Als nächstes folgte die Zugabe von 50 µl Antikörper in der je nach Versuch benötigten Konzentration; bei den Kontrollen wurden, wie oben bereits erwähnt, 50 µl Medium hinzugefügt. Bei den biotinylierten Antikörpern wurde von den folgenden Ursprungskonzentrationen ausgegangen:

bCD19, bROR1 → 11 ng/µl

bCD20 → 55 ng/µl

bControl → 30 ng/µl (Angabe von Miltenyi Biotec GmbH)

Die Einstellung der benötigten Antikörperkonzentration erfolgte durch Aufnahme der entsprechenden Antikörpermenge in Zellmedium.

Nun fand die Zugabe der AdCAR-T-Zellen (Effektor-Zellen) statt, in den Versuchen mit JeKo-1 als Target-Zellen wurde eine E:T-Ratio (= Effektor-Target-Verhältnis) von 1:1 gewählt (vgl. Kapitel III.2.2). D. h. es wurden 50 µl AdCAR-T-Zellen in der Konzentration 1×10^6 Zellen pro ml pro Well hinzugefügt, sodass sich ebenfalls 50 000 Zellen in jedem Well befanden. Auch dieser Schritt wurde bei den Kontrollen durch 50 µl Medium ersetzt.

Abschließend wurden unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung auf alle 96 Wells je 50 µl Medium mit Luciferin pipettiert. Verwendet wurde in DMSO gelöstes synthetisches D-Luciferin in der Konzentration 0,1 µg/µl, wobei je ein 50 µl-Aliquot in 5ml Medium gemischt wurde; d. h. für das Medium ergab sich eine Luciferin-Konzentration von 1 µg/ml. Die Endkonzentration im Well (200 µl) betrug also 0,25 µg/ml (Tab. II-1).

Tab. II-1 Zusammenfassung der benötigten Mischverhältnisse beim Luciferase-basierten Kill-Assay

| | Gesamtvolumen 200 µl |
|---|---|
| 100 %-/75 %-/50 %-/25 %-/10 %- Kontrolle | 50 µl Target-Zellen (jeweilige Verdünnung) 100 µl Medium 50 µl Luciferin |
| 0 %-Kontrolle | 150 µl Medium 50 µl Luciferin |
| Ohne mAb-Kontrolle | 50 µl Target-Zellen 50 µl Effektor-Zellen 50 µl Medium 50 µl Luciferin |
| Versuchskondition | 50 µl Target-Zellen 50 µl Effektor-Zellen 50 µl mAb 50 µl Luciferin |

Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Nach 12, 24, 48 und 72 Stunden (je nach Versuch) wurde die Lumineszenz der Target-Zellen (JeKo-1) im Victor 1420 Multilabel Counter gemessen und daraus deren prozentuale Lyse durch die Effektor-Zellen (AdCAR-T-Zellen) berechnet.

Die Berechnung der Lyse erfolgte mittels einer einheitlichen Auswertetabelle in Microsoft Excel, in die die Rohdaten aus der Lumineszenz-Messung („Counts“) eingespeist wurden. Die Lyse wurde anhand einer Vergleichsgerade angenähert. Diese ergab sich aus den Mittelwerten der Versuchskontrollen (0 %, 25 %, 50 %, 85 % und 100 % Anteil an Target-Zellen) von der jeweiligen Platte. In Abb. II-5 ist beispielhaft eine solche Vergleichsgerade dargestellt, die die Zuordnung der gemessenen Counts zu einem Lysewert ermöglicht. Folglich ergäbe sich für das in der Abbildung dargestellte Beispiel eines gemessenen Counts von 2000 eine Lyse von circa 60 %.

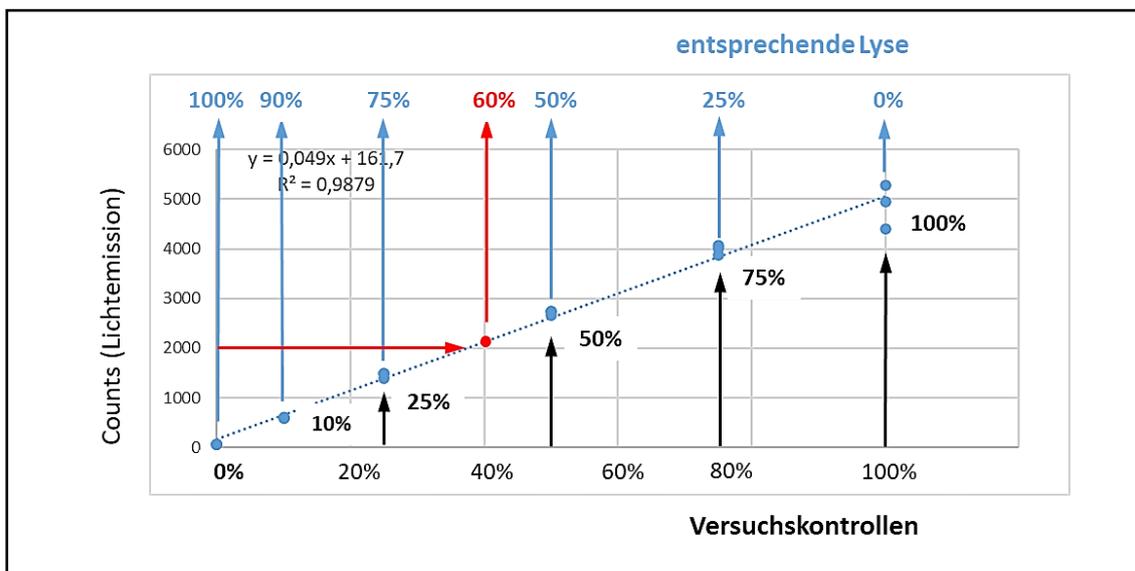


Abb. II-5 Beispiel einer Vergleichsgerade für die Zuordnung der Counts zum entsprechenden Lysewert

Für die Auswertung der Luciferase-basierten Kill-Assays wurde die 0 %-Kontrolle (reines Medium mit Luciferin) mit der 100 %-Lyse, die 10 %-Kontrolle mit der 90 %-Lyse und ebenso alle anderen Kontrollen 25 %, 50 %, 75 % und 100 % mit den entsprechenden prozentualen Lysen gleichgesetzt. Anschließend konnte jedem Messwert der Platte mithilfe der Ausgleichsgerade ein Lysewert zugeordnet werden, z. B. hätte hier ein Well mit Count 2000 eine Lyse von circa 60 %.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Luciferase-basierten Kill-Assays wurden mit der Software GraphPad Prism 7.0 statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

Es wurden meist drei bis fünf Gruppen miteinander verglichen, weshalb der One-way ANOVA (analysis of variance) als Analyseart gewählt wurde. Mit diesem können die Mittelwerte von zwei oder mehr Datensätzen verglichen und auf einen signifikanten Unterschied untersucht werden. Die Signifikanz drückt sich als p-Wert aus, wobei $p \leq 0,05$ anzustreben ist.

Zusätzlich zum One-way ANOVA wurde der Tukey's multiple comparisons test verwendet, um die Mittelwerte aller einzelnen Datensätze untereinander zu vergleichen und auf signifikante Unterschiede zu untersuchen. Eine Legende für die in dieser Arbeit verwendeten Darstellung der Signifikanz in Graphiken findet sich in Tabelle II-2.

Tab. II-2 Graphische Darstellung der Signifikanz

| p-Wert | Darstellung in der Graphik |
|----------------------|-----------------------------------|
| ns (not significant) | $p > 0,05$ |
| * | $p \leq 0,05$ |
| ** | $p \leq 0,01$ |
| *** | $p \leq 0,001$ |
| **** | $p \leq 0,0001$ |

2.7 FACS-basierter Kill-Assay

Diese Versuche wurden in einer 48-Well-Platte (Flachboden) durchgeführt, als Medium diente auch hier das JeKo-1-Kulturmedium (vgl. Kapitel II.1.5). Das Endvolumen pro Well war 500 μl .

Die Grundzusammensetzung bestand stets aus je 100 μl Tumorzellen (JeKo-1-Zellvariante), biotinyliertem Antikörper und AdCAR-T-Zellen, insgesamt also 300 μl . Dazu kamen je 200 μl Medium, um auf ein Endvolumen von 500 μl zu kommen. Bei den Kontrollen wurde die fehlende Komponente durch Medium ersetzt, was prinzipiell dem Vorgehen beim Luciferase-basierten Kill-Assay entsprach.

Zu Beginn wurden jeweils 100 μl Target-Zellen in der Konzentration 1×10^6 Zellen pro ml in jedes Well pipettiert, sodass sich jeweils eine Zahl von 100 000 Zellen ergab. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl Antikörper in der je nach Versuch benötigten Konzentration; die Ursprungskonzentrationen der verwendeten Antikörper wurden in Kapitel II.2.5 aufgelistet. Die benötigte Antikörperkonzentration wurde durch Aufnahme der entsprechenden Antikörpermenge in Zellmedium eingestellt.

Im nächsten Schritt wurden je 100 μl AdCAR-T-Zellen (Effektor-Zellen) in der Konzentration 2×10^6 Zellen pro ml in jedes Well zugegeben, also 200 000 Zellen. Dies entsprach folglich einer E:T-Ratio (= Effektor-Target-Verhältnis) von 2:1. Die AdCAR-T-Zellen wurden außerdem vor dem Ansatz des Versuchs für 48 Stunden in zytokinfreiem Medium gehalten, d. h. in TexMACS-Medium mit Penicillin/Streptomycin ohne sonstige Zusätze.

Als letztes fand ein Auffüllen des Volumens mit Zellkulturmedium auf 500 μl statt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C für bis zu 96 Stunden inkubiert. Vor der Messung erfolgte eine FACS-Färbung, wie in Kapitel II.2.2 beschrieben, mit CD3-VioBlue, CD20-PE und CD19-APC. Dazu wurde jedes Well des Versuchs vorsichtig in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messzeitpunkte unterschieden sich in den Versuchen teilweise und werden im Ergebnisteil an entsprechender Stelle mitgeteilt.

Zur Normalisierung der Zellzahlen wurden 15 µl neutrale Beads zugegeben, die Messung wurde nach 100 000 Events im Beads-Gate gestoppt. Die Populationen der AdCAR-T-Zellen und JeKo-1-Varianten wurden zunächst gemeinsam in einem Gate zusammengefasst. Nach dem Gating der Einzelzellen wurden die Populationen der AdCAR-T-Zellen und JeKo-1-Varianten nach GFP- bzw. CD3-Positivität getrennt dargestellt. Die vier JeKo-1-Varianten wurden anschließend nach CD19 und CD20 aufgeschlüsselt (siehe *Abb. II-6*).

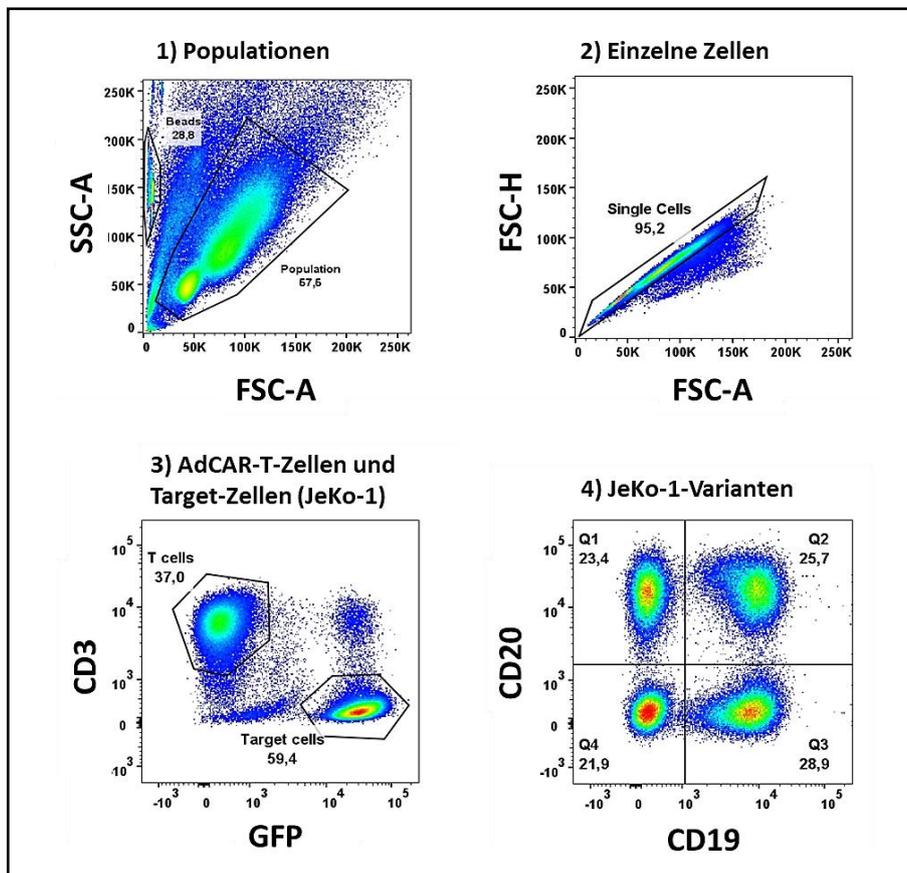


Abb. II-6 Gating-Strategie bei FACS-basierten Kill-Assays

Die Beads waren als eigene Population gut abgrenzbar und wurden zur Normalisierung der Zellzahlen verwendet; bei 100 000 Events wurde die Messung angehalten. Zunächst wurden die Zellpopulationen in einem gemeinsamen Gate markiert. Nun wurden die einzelnen Zellen in ein Gate gesetzt. Anschließend wurden die Populationen der AdCAR-T-Zellen und JeKo-1-Varianten nach GFP- bzw. CD3-Positivität getrennt gegatet. Eine Aufschlüsselung der JeKo-1-Varianten nach CD19 und CD20 erfolgte in einem weiteren Fenster.

III. ERGEBNISSE

In einem ersten Schritt wurde die in dieser Arbeit verwendete Zellkultur (JeKo-1) auf verschiedene Oberflächenmarker gescreent (CD19, CD20, ROR1, CD22, CD79b und CD276).

Anschließend erfolgte eine Evaluation der Tauglichkeit von JeKo-1 für die geplanten Versuche in Bezug auf die Luciferase-Aktivität, das für eine optimale Lyse notwendige Verhältnis von AdCAR-T-Zellen und Tumorzellen sowie die benötigte Antikörper-Konzentration.

Im Folgenden wurden die drei Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie überprüft. Hierzu erfolgte zunächst eine Testung der Lysefähigkeit der AdCAR-T-Zellen hinsichtlich ihrer Antigen- und Antikörperabhängigkeit, der zeitlichen Entwicklung der Lyse sowie der Vergleichbarkeit verschiedener Spender (*Steuerbarkeit*). Nach einem Nebenversuch zum Vergleich konventioneller CAR-T-Zellen mit AdCAR-T-Zellen wurde die Problematik eines Therapieversagens durch Antigenverlust mit JeKo-1-Knockout-Varianten simuliert und mit kombiniertem multiplem bzw. sequenziellem Targeting angegangen (*Flexibilität*). Dann erfolgte mittels Antikörpertitration eine Untersuchung der Schwellenkonzentration, die für die AdCAR-T-Zell-Aktivierung notwendig ist. Abschließend wurden mehrere Antikörper in unterschwelliger Konzentration kombiniert und deren selektive Wirkung auf Tumorzellen mit einzelnen Antikörperdosen verglichen (*Selektivität*).

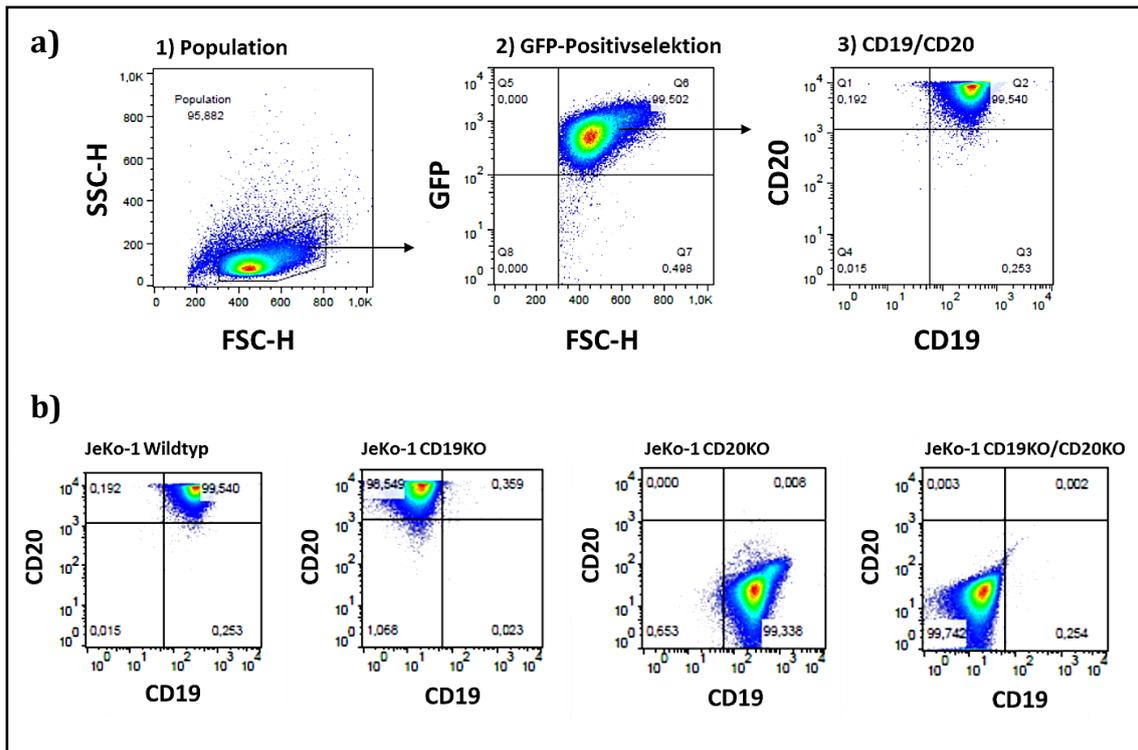
1. Antigenscreening der Tumor-Zellkultur

Vor Beginn der Versuchsreihe erfolgte ein FACS-Screening der Zelllinie JeKo-1 (B-Mantelzell-Lymphom) auf diverse Oberflächen-Antigene. Diese wurde von der Firma Miltenyi Biotec GmbH in vier verschiedenen Knockout-Varianten zur Verfügung gestellt: JeKo-1 Wildtyp, JeKo-1 CD19KO, JeKo-1 CD20KO und JeKo-1 CD19KO/CD20KO.

1.1 Expression von CD19 und CD20 auf JeKo-1-Varianten

Im ersten Schritt wurden die Knockout-Eigenschaften der vorliegenden Zellvarianten durch ein Screening auf die Antigene CD19 und CD20 überprüft. Dies erfolgte durch eine Primärfärbung auf CD19-APC bzw. CD20-PE.

Das Gating fand in zwei Schritten statt: Zunächst wurde die Zellpopulation markiert und anschließend nach GFP-positiven JeKo-1-Zellen selektiert. Hierbei waren bei allen JeKo-1-Varianten > 99 % der markierten Zellpopulation GFP-positiv. Die Variante JeKo-1 Wildtyp war sowohl zu > 99 % CD19-positiv als auch CD20-positiv, JeKo-1 CD19KO war CD19-negativ, JeKo-1 CD20KO war CD20-negativ und JeKo-1 CD19KO/CD20KO war sowohl CD19-negativ als auch CD20-negativ (siehe *Abb. III-1*).



**Abb. III-1 a) Gating-Strategie anhand JeKo-1 Wildtyp
b) FACS-Screening aller JeKo-1-Varianten**

a) Die Gating-Strategie ist hier am Beispiel von JeKo-1 Wildtyp dargestellt. Die JeKo-1-Zellpopulation wurde zunächst markiert und anschließend auf die GFP-Achse aufgetragen. Hierbei wurde ersichtlich, dass bei allen JeKo-1-Varianten eine dichte, zu > 99 % GFP-positive Zellpopulation bestand. Anschließend erfolgt die Darstellung im CD19/CD20-Plot.

b) Zur Überprüfung des Antigen-Knockouts wurden alle vier JeKo-1-Varianten in CD19/CD20-Plots dargestellt. Die Knockout-Varianten waren jeweils zu > 99 % rein.

In *Tab. III-1* ist die numerische Auswertung des durchflusszytometrischen Screenings von JeKo-1 auf die Antigene CD19 und CD20 dargestellt, bestehend aus gemessener Zellzahl, geometrischem Mittelwert und MFIR.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFIR = mean fluorescence intensity ratio) wurde aus dem geometrischen Mittelwert (GMW) und der unstained-Kontrolle berechnet:

$$\text{MFIR} = \text{GMW} / \text{GMW Kontrolle (unstained)}$$

Die MFIR ist ein Maß für die Menge des gebundenen Fluoreszenzmarkers und damit für die Dichte des exprimierten Antigens. Die MFIR-Werte für CD19 betragen bei den JeKo-1-Varianten CD19KO und CD19KO/CD20KO (erwartet CD19-negativ) < 9 und bei den JeKo-1-Varianten Wildtyp und CD20KO (erwartet CD19-positiv) > 135. Bezüglich CD20 betragen die MFIR-Werte bei den JeKo-1-Varianten CD20KO und CD19/20KO (erwartet CD20-negativ) < 13 und bei den JeKo-1-Varianten Wildtyp und CD19KO (erwartet CD20-positiv) > 3700 (siehe *Tab. III-1*).

Die JeKo-1-Knockout-Varianten exprimieren das jeweilige Knockout-Antigen wie erwartet nicht und können für die folgenden Versuche verwendet werden. Zudem sind die JeKo-1-Antigene als Target-Antigene für Versuche zur antigenspezifischen Lyse verwendbar.

Tab. III-1 Auswertung des FACS-Screenings (CD19 und CD20)

| CD19-APC | Gemessene Zellzahl | Geometrischer Mittelwert | MFIR |
|----------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------|
| Wildtyp | 107101 | 333,7 | 159,4 |
| CD19KO | 104097 | 18,0 | 8,9 |
| CD20KO | 107473 | 290,3 | 135,0 |
| CD19KO/CD20KO | 102151 | 18,1 | 8,5 |
| CD20-PE | Gemessene Zellzahl | Geometrischer Mittelwert | MFIR |
| Wildtyp | 107101 | 6351,2 | 4450,7 |
| CD19KO | 104097 | 5453,0 | 3712,0 |
| CD20KO | 107473 | 19,2 | 13,0 |
| CD19KO/CD20KO | 102151 | 16,2 | 10,6 |

1.2 Expression von weiteren Antigenen auf JeKo-1-Varianten

Im zweiten Schritt wurden die vier vorliegenden JeKo-1-Varianten Wildtyp, CD19KO, CD20KO und CD19KO/CD20KO auf die Expression weiterer Antigene untersucht. Hierfür wurden die Antigene ROR1, CD22, CD79b und CD276 ausgewählt und mit einer Anti-Biotin-APC Sekundärfärbung behandelt.

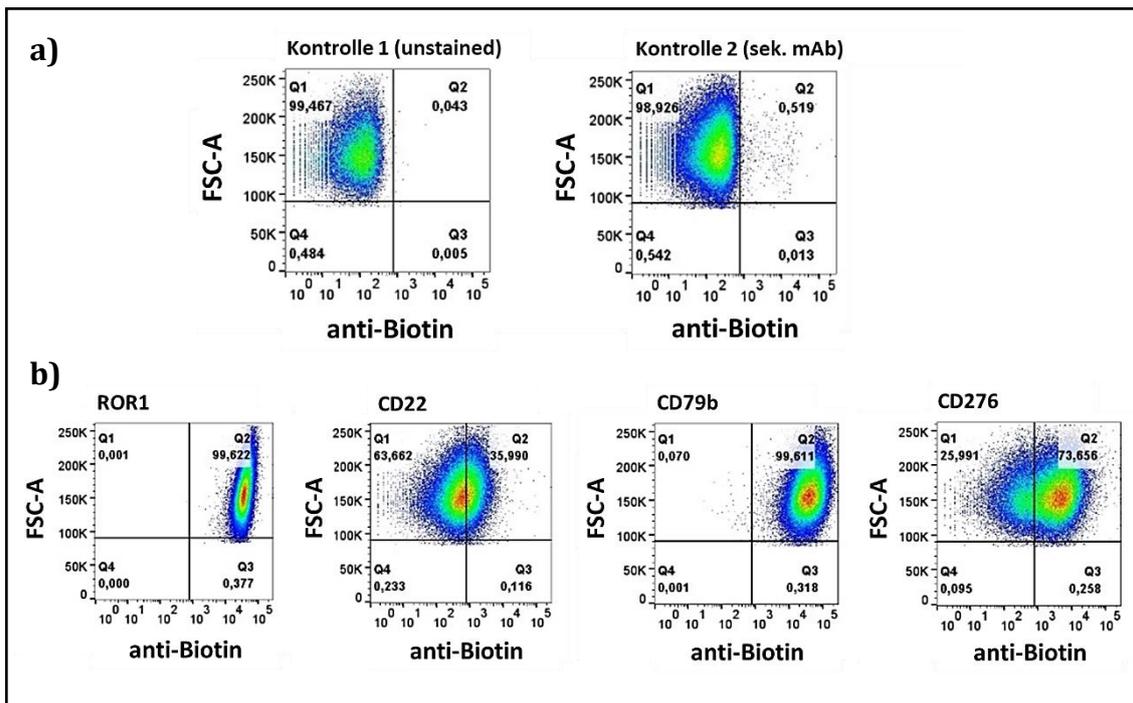


Abb. III-2 a) Kontrollen b) FACS-Screening am Beispiel von JeKo-1 Wildtyp

a) Kontrolle 1 (unstained) im Vergleich mit Kontrolle 2 (Anfärbung nur mit dem Sekundär-Antikörper Anti-Biotin-APC).

b) Überprüfung der Expression von ROR1, CD22, CD79b und CD276 auf JeKo-1. Hier sind nur beispielhaft diejenigen von JeKo-1 Wildtyp dargestellt, diejenigen der anderen JeKo-1-Varianten waren vergleichbar.

Das Gating erfolgte wie in Kapitel III.1.1 bereits beschrieben. Als Kontrollen dienten jeweils eine Unstained-Probe jeder JeKo-1-Variante sowie eine Färbung nur mit dem sekundären Antikörper, Anti-Biotin-APC. Da die FACS-Plots der verschiedenen

JeKo-1-Varianten vergleichbar sind, werden hier nur beispielhaft diejenigen von JeKo-1 Wildtyp abgebildet (siehe *Abb. III-2*).

Tab. III-2 Auswertung des FACS-Screenings (ROR1, CD22, CD79b, CD276)

| | Zellzahl | Geometrischer Mittelwert | MFIR | MFIR MW | MFIR SD |
|----------------------|----------|--------------------------|-------|------------|------------|
| ROR1 | | | | | |
| Wildtyp | 88402 | 34275,4 | 665,8 | 654,0 | 44,9 |
| CD19KO | 89202 | 30439,7 | 644,3 | | |
| CD20KO | 89541 | 32092,0 | 599,0 | | |
| CD19KO/CD20KO | 88665 | 26693,9 | 706,8 | | |
| CD22 | | | | | |
| Wildtyp | 88937 | 408,0 | 7,9 | 6,8 | 1,1 |
| CD19KO | 90882 | 282,6 | 6,0 | | |
| CD20KO | 89603 | 412,0 | 7,7 | | |
| CD19KO/CD20KO | 88026 | 215,8 | 5,7 | | |
| CD79b | | | | | |
| Wildtyp | 88660 | 33862,8 | 657,8 | 316,3 | 272,0 |
| CD19KO | 90009 | 19445,3 | 411,6 | | |
| CD20KO | 90474 | 4090,8 | 76,4 | | |
| CD19KO/CD20KO | 88714 | 4510,6 | 119,4 | | |
| CD276 | | | | | |
| Wildtyp | 89515 | 1572,3 | 30,5 | 20,6 | 8,9 |
| CD19KO | 90329 | 701,2 | 14,8 | | |
| CD20KO | 90431 | 619,5 | 11,6 | | |
| CD19KO/CD20KO | 88322 | 957,6 | 25,4 | | |

In *Tab. III-2* ist die numerische Auswertung des FACS-Screenings auf die alternativen Antigene ROR1, CD22, CD79b und CD276 dargestellt. Um die Expression dieser Antigene auf den verschiedenen JeKo-1-Varianten vergleichen zu können, erfolgte zudem eine Berechnung des Mittelwerts (MW) sowie der Standardabweichung (SD) der MFIR.

Die mittlere Fluoreszenzintensität MFIR wurde diesmal aus dem geometrischen Mittelwert (GMW) und der Kontrolle mit dem sekundären Antikörper Anti-Biotin-APC berechnet:

$$\mathbf{MFIR} = \text{GMW} / \text{GMW Kontrolle (sek. mAb)}$$

Die MFIR-Werte für ROR1 betragen im Mittel 654,0 mit einer Standardabweichung $SD = 44,9$. Da es damit das einzige Antigen dieser Auswahl war, das durchgängig auf allen JeKo-1-Varianten stark exprimiert wurde und jeweils eine vergleichbare MFIR aufwies, wurde ROR1 für die weiteren Versuche als Target-Antigen ausgewählt (siehe *Tab. III-2*).

2. Vortitrationen mit JeKo-1

2.1 Luciferase-Aktivität von JeKo-1

Zunächst wurde die Funktion der Luciferase in den JeKo-1-Zellvarianten getestet, und ob diese eine Korrelation mit dem Zellwachstum aufwies. Hierfür wurden für alle JeKo-1-Varianten 100 000 Zellen pro Well über 48 Stunden mit Luciferin inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Wells mit Medium und Luciferin angesetzt sowie Wells, die Zellen in Medium ohne Luciferin enthielten (siehe *Abb. III-3*).

Anschließend wurde die adäquate Zellzahl pro Well (96-Well-Platte) für die folgenden Luciferase-Kill-Assays bestimmt. Dazu wurden die Konditionen 25 000, 50 000 und 75 000 Zellen und als Kontrollen 50 000 JeKo-1-Zellen ohne Luciferin sowie nur Luciferin über 48 Stunden inkubiert (siehe *Abb. III-4*).

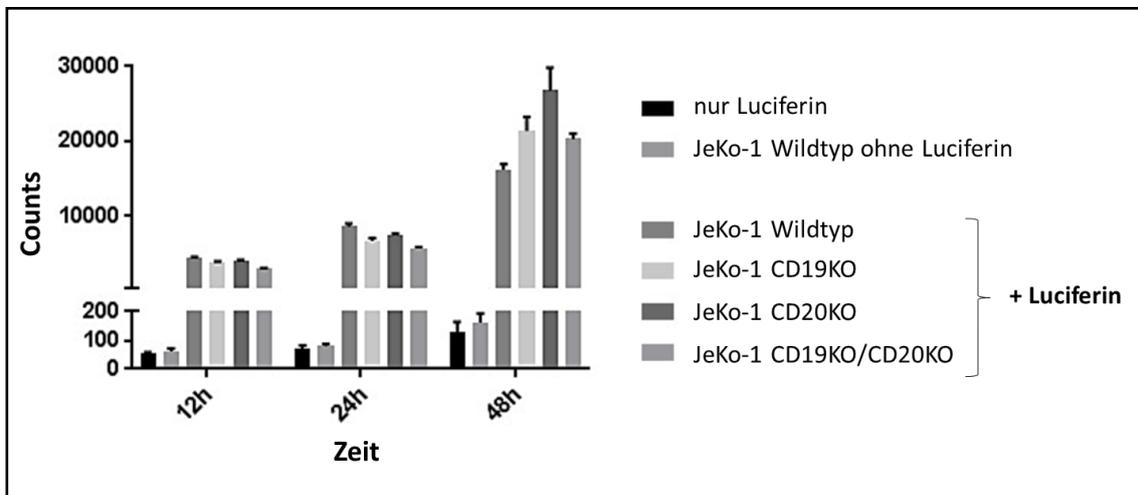


Abb. III-3 Zeitliche Entwicklung der Luciferase-Aktivität

Bei der Beobachtung der Lumineszenz-Counts aller vier JeKo-1-Varianten (100 000 Zellen pro Well) über die Zeit zeigte sich ein Anstieg über die gemessenen Zeitpunkte 12, 24 und 48 Stunden hinweg. Die Negativkontrollen, bestehend aus zelllosen Kontrollen nur mit Luciferin sowie Wells mit Zellen ohne Luciferin, blieben bei Counts < 200 ($n_{\Sigma} = 1$).

[Adaptiert aus dem Manuskript *Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*]

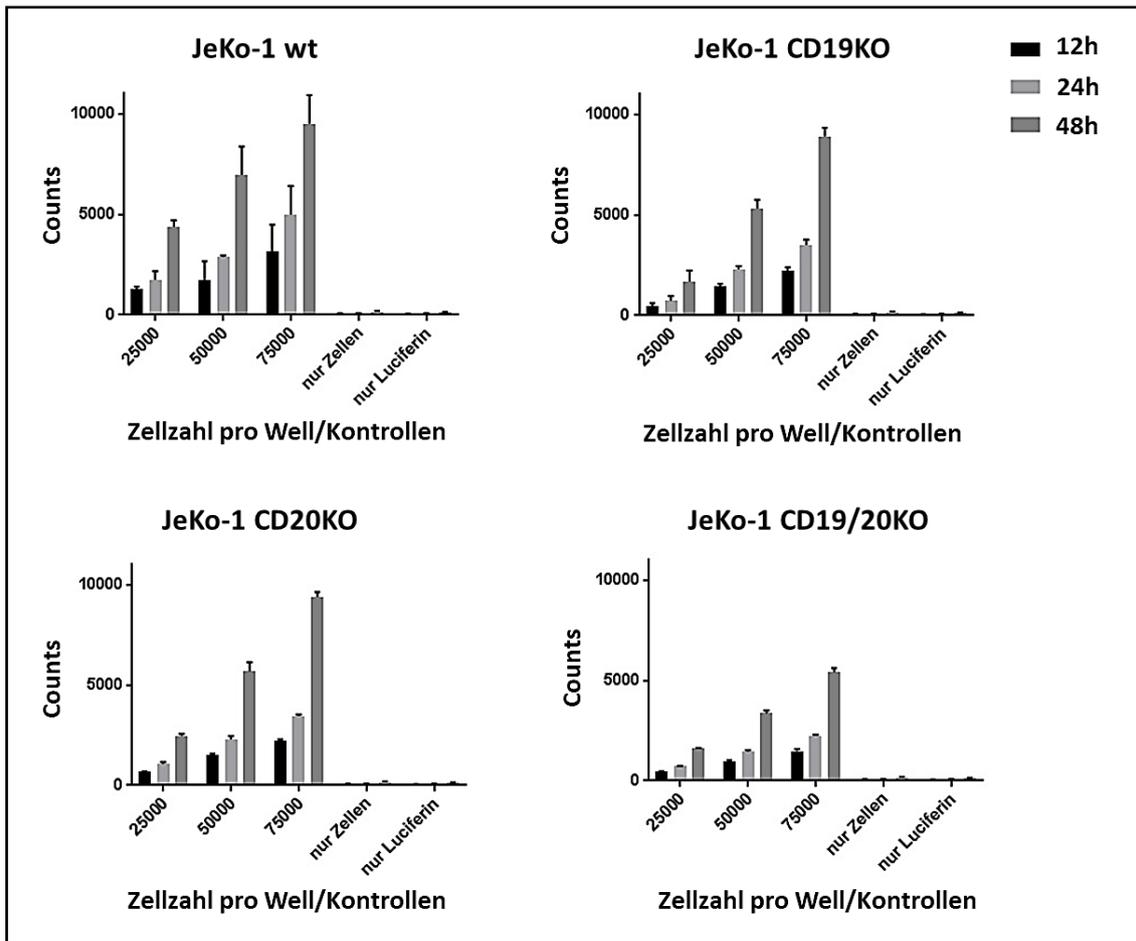


Abb. III-4 Zellzahl-Titration von JeKo-1-Varianten

Von allen vier JeKo-1-Varianten wurden Wells mit 25 000, 50 000 und 75 000 Zellen mit Luciferin inkubiert. Als Kontrollen dienten Wells mit 50 000 Zellen ohne Luciferin sowie Wells nur mit Medium und Luciferin. Es konnte mit Anstieg der Zellzahl ein Anstieg der Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Die verschiedenen Zellvarianten wichen teilweise etwas voneinander ab. Die Counts aller Kontrollen lagen < 200 ($n_{\Sigma} = 1$).

Für 50 000 Zellen betragen der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus allen JeKo-1-Varianten 5005,3 bzw. 1778,9 Counts ($n_{\Sigma} = 4$). Nach Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe ist ein Count von 5000 nach 48 Stunden Inkubation ausreichend, weswegen für die folgenden Versuche jeweils eine Zellzahl von 50 000 JeKo-1-Zellen pro Well verwendet wurde.

2.2 Effektor-Target-Verhältnis und Antikörper-Konzentration

Für die Austestung des Effektor-Target-Verhältnisses (E:T-Ratio) wurden über 48 Stunden die biotinylierten Antikörper bCD19 und bControl (unspezifischer Kontrollantikörper) mit jeweils 50 000 JeKo-1 Wildtyp inkubiert. Es erfolgte eine Titration der E:T-Ratios 5:1, 2:1, 1:1 und 0,5:1 mit AdCAR-T-Zellen. Zusätzlich wurden Kontrollen mit AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper angesetzt (siehe *Abb. III-5*). Als Antikörper-Konzentration wurde entsprechend der Vorerfahrung in der Arbeitsgruppe 10ng/ml gewählt, wobei diese Konzentration im Folgeversuch reevaluiert wird.

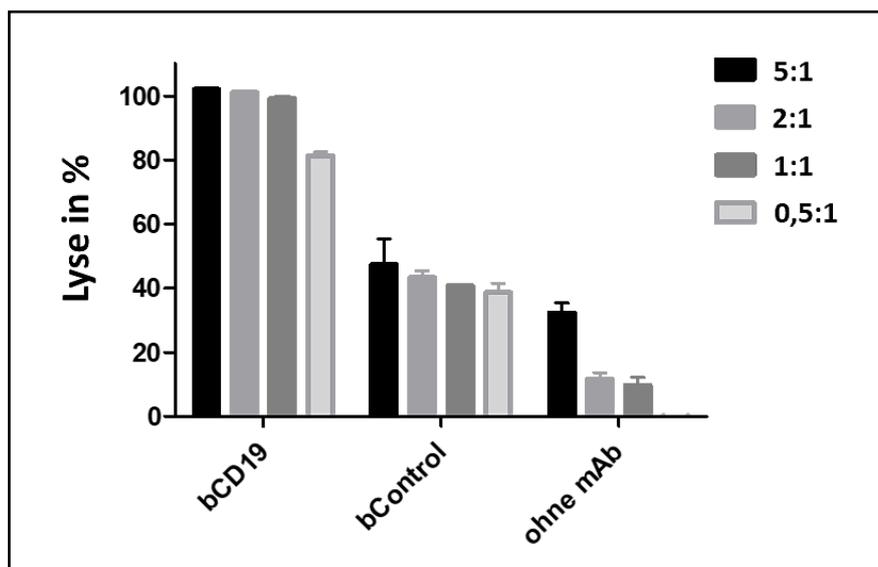


Abb. III-5 E:T-Titration von JeKo-1

Mit 50 000 Zellen pro Well (JeKo-1 Wildtyp) wurden über 48 Stunden die E:T-Ratios 5:1, 2:1, 1:1 und 0,5:1 inkubiert. Als Konditionen wurden jeweils Tumorzellen mit AdCAR-T-Zellen und dem spezifischen Antikörper bCD19 sowie mit dem unspezifischen Kontrollantikörper bControl, als Kontrollen zusätzlich AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper, angesetzt. Mit 5:1, 2:1 und 1:1 wurde eine Lyse von annähernd 100 % erreicht, die unspezifische Lyse mit bControl betrug stets < 50 % und ohne Antikörper bei 2:1, 1:1 und 0,5:1 < 10 % ($n_{\Sigma} = 1$, mAb-Konzentration 10 ng/ml).

Mit den E:T-Ratios 5:1, 2:1 und 1:1 konnten Lysewerte von circa 100 % erreicht werden. Alle Konditionen wiesen eine unspezifische Lyse mit bControl von circa 40 % auf. Bei der Kontrolle mit AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper war die Lyse für 2:1, 1:1 und 0,5:1 < 10 %. Für die folgenden Luciferase-basierten Kill-Assays wurde die E:T-Ratio 1:1 als angemessen definiert, da die Balance zwischen spezifischer und unspezifischer Lyse (circa 100 % vs. circa 10 %) als optimal befunden wurde.

Wie erwähnt beruhte die bei der E:T-Titration verwendete Antikörper-Konzentration von 10 ng/ml auf bisherigen Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe und wurde mit einer Antikörper-Titration verifiziert. Hierzu wurde als ‚gute Lyse‘ eine Lyse von $\geq 85\%$ mit spezifischem Biotin-Antikörper (bei JeKo-1 Wildtyp beispielsweise bCD19) sowie einer unspezifischen Antikörper-abhängigen Lyse (mit bControl) von $\leq 50\%$ definiert. Die Konditionen hierfür waren 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml. Der Ansatz wurde mit einer Zellzahl von 50 000 JeKo-1-Zellen (Wildtyp) und der E:T-Ratio 1:1 durchgeführt (siehe *Abb. III-6*).

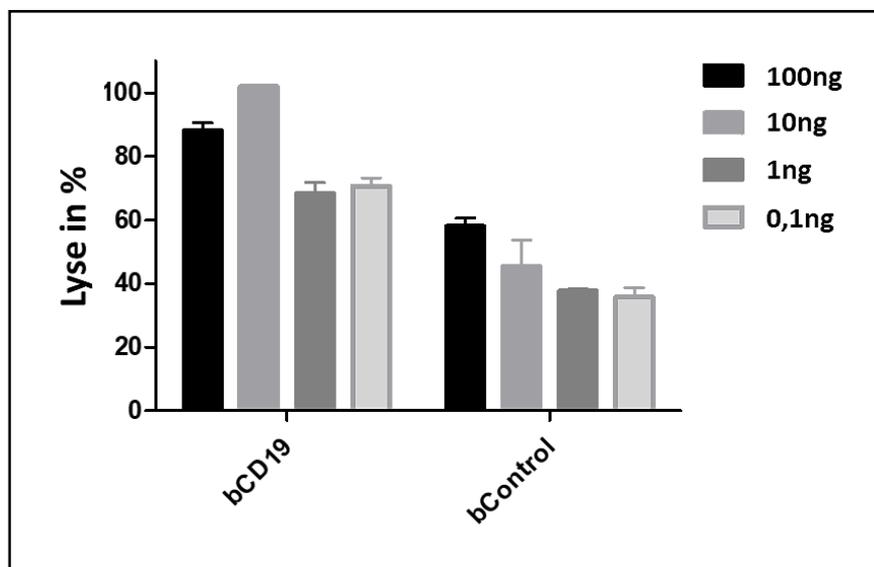


Abb. III-6 Titration der Antikörper-Konzentrationen

Die Antikörper-Konzentrationen 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml wurden über 48 Stunden (E:T 1:1) inkubiert. Als Konditionen wurden JeKo-1 Wildtyp mit AdCAR-T-Zellen und den Antikörpern bCD19 und bControl angesetzt. Mit der Konzentration 10 ng/ml wurde eine spezifische Lyse von 100 % sowie eine unspezifische Lyse von < 50 % erzielt ($n_{\Sigma} = 1$).

Die beste Lyse (100 % mit bCD19, < 50 % mit bControl) konnte mit einer Antikörper-Konzentration von 10 ng/ml erreicht werden. Für die folgenden Luciferase-basierten Kill-Assays wurde diese Konzentration als Standard festgelegt.

3. Steuerbarkeit der Lyse von Tumorzellen durch AdCAR-T-Zellen

Zunächst wurde geprüft, ob die Lyse von Tumorzellen (in diesem Fall die Lyse der vier JeKo-1-Zellvarianten) durch AdCAR-T-Zellen streng abhängig ist von den zugegebenen biotinylierten Antikörpern sowie von der Expression des Target-Antigens durch die Tumorzellen. Dieser spezifische Lyse-Effekt sollte durch Luciferase-basierte Kill-Assays und FACS-basierte Kill-Assays nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Lyse im Zeitverlauf betrachtet sowie ein Vergleich der Lyse durch AdCAR-T-Zellen verschiedener gesunder Spender durchgeführt. Das Prinzip der Luciferase-basierten und FACS-basierten Kill-Assays sowie der genaue Versuchsaufbau wurde in Kapitel II beschrieben.

Die spezifischen Konditionen für den Luciferase-basierten Kill-Assay, dessen Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden, waren:

- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD20
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bControl
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen ohne mAb

Als E:T-Ratio wurde 1:1 festgelegt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln für die verwendeten Antikörper (bCD19 und bCD20) als reine Lyse oder als bControl-normalisierte Lyse dargestellt. Das heißt, dass die Lyse mit dem unspezifischen biotinylierten Kontrollantikörper bControl als ‚Nullpunkt‘ festgelegt wird und somit die Lyse dargestellt wird, die allein aufgrund des spezifischen Effekts der passenden Antikörper bCD19 und bCD20 geschieht. Die Berechnung erfolgte folgendermaßen:

$$\text{bControl-normalisierte Lyse} = \frac{(\text{Lyse mit b[mAb]} - \text{Lyse mit bControl})}{(1 - \text{Lyse mit bControl})}$$

In der Ergebnistabelle werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur der Mittelwert der Spender und die Standardabweichung der jeweiligen Konditionen angegeben. Es wurden drei Gesamtmessungen ($n_{\Sigma} = 3$) durchgeführt, die sich aus jeweils 15 Einzelwerten von drei gesunden Spendern (D1, D2 und D3) zusammensetzen, womit sich eine Gesamtzahl von 45 Einzelmessungen ($n = 45$) pro Kondition ergibt. Die Inkubation erfolgte in 96-Well-Platten über 48 Stunden und die Messung zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 Stunden (siehe *Tab. III-3*).

**Tab. III-3 Ergebnisse des Kill-Assays mit bCD19 und bCD20:
Reine Lyse nach 48 Stunden**

| JeKo-1 wt | D1 | D2 | D3 | MW | SD |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| bCD19 | 83,4 % | 91,5 % | 96,4 % | 90,4 % | 6,4 % |
| bCD20 | 97,5 % | 101,7 % | 99,0 % | 99,4 % | 2,0 % |
| bControl | 18,8 % | 33,6 % | 33,1 % | 28,5 % | 10,2 % |
| ohne mAb | 31,8 % | 6,7 % | 44,0 % | 27,5 % | 19,4 % |
| JeKo-1 CD19KO | | | | | |
| bCD19 | 39,1 % | 27,2 % | 60,2 % | 42,2 % | 14,9 % |
| bCD20 | 98,8 % | 102,6 % | 101,7 % | 101,0 % | 1,9 % |
| bControl | 48,0 % | 26,4 % | 62,7 % | 45,7 % | 16,1 % |
| ohne mAb | 24,0 % | -2,3 % | 50,6 % | 24,1 % | 24,3 % |
| JeKo-1 CD20KO | | | | | |
| bCD19 | 81,6 % | 83,5 % | 97,8 % | 87,6 % | 7,9 % |
| bCD20 | 18,6 % | 19,4 % | 34,0 % | 24,0 % | 10,5 % |
| bControl | 22,6 % | 27,5 % | 34,5 % | 28,2 % | 6,7 % |
| ohne mAb | 21,3 % | 12,7 % | 37,8 % | 23,9 % | 14,3 % |
| JeKo-1 CD19/20KO | | | | | |
| bCD19 | 36,9 % | 27,8 % | 61,0 % | 41,9 % | 15,4 % |
| bCD20 | 30,0 % | 14,2 % | 53,0 % | 32,4 % | 19,5 % |
| bControl | 37,1 % | 17,8 % | 57,0 % | 37,3 % | 17,3 % |
| ohne mAb | 32,9 % | 10,8 % | 53,3 % | 32,3 % | 21,1 % |

3.1 Antigen- und Antikörper-abhängige Lyse von Tumorzellen

Für bCD19 wurde nach 48 Stunden bei den CD19-positiven JeKo-1-Varianten Wildtyp und CD20KO im Mittel eine reine Lyse von 90,4 % bzw. 87,6% sowie eine bControl-normalisierte Lyse von 87,1 % bzw. 83,4 % gemessen. Bei den CD19-negativen JeKo-1-Varianten CD19KO und CD19/20KO ergab sich im Mittel eine reine Lyse von 42,2 % bzw. 41,9 % und eine bControl-normalisierte Lyse von -7,6 % bzw. 7,1 %.

Bezüglich bCD20 wurde bei den CD20-positiven JeKo-1-Varianten Wildtyp und CD19KO im Mittel eine reine Lyse von 99,4 % bzw. 101,0 % gemessen sowie eine bControl-normalisierte Lyse von 99,4 % bzw. 101,9 %. Bei den anderen beiden CD20-negativen JeKo-1-Varianten CD20KO und CD19/20KO ergab sich im Mittel eine reine Lyse von 24,0 % bzw. 32,4 % und eine bControl-normalisierte Lyse von -5,6 % bzw. -8,4 %.

Folglich wurde also bei den JeKo-1-Varianten, die das passende Target-Antigen exprimierten, mit dem jeweiligen biotinylierten Antikörper in Kombination mit AdCAR-T-Zellen eine reine Lyse von $\geq 87,6$ % bzw. eine normalisierte Lyse von $\geq 83,4$ % erreicht. Dagegen liegen die Werte der unspezifischen Lyse im Mittel bei $\leq 45,7$ %.

Die Ergebnisse sind in Abb. III-7 dargestellt.

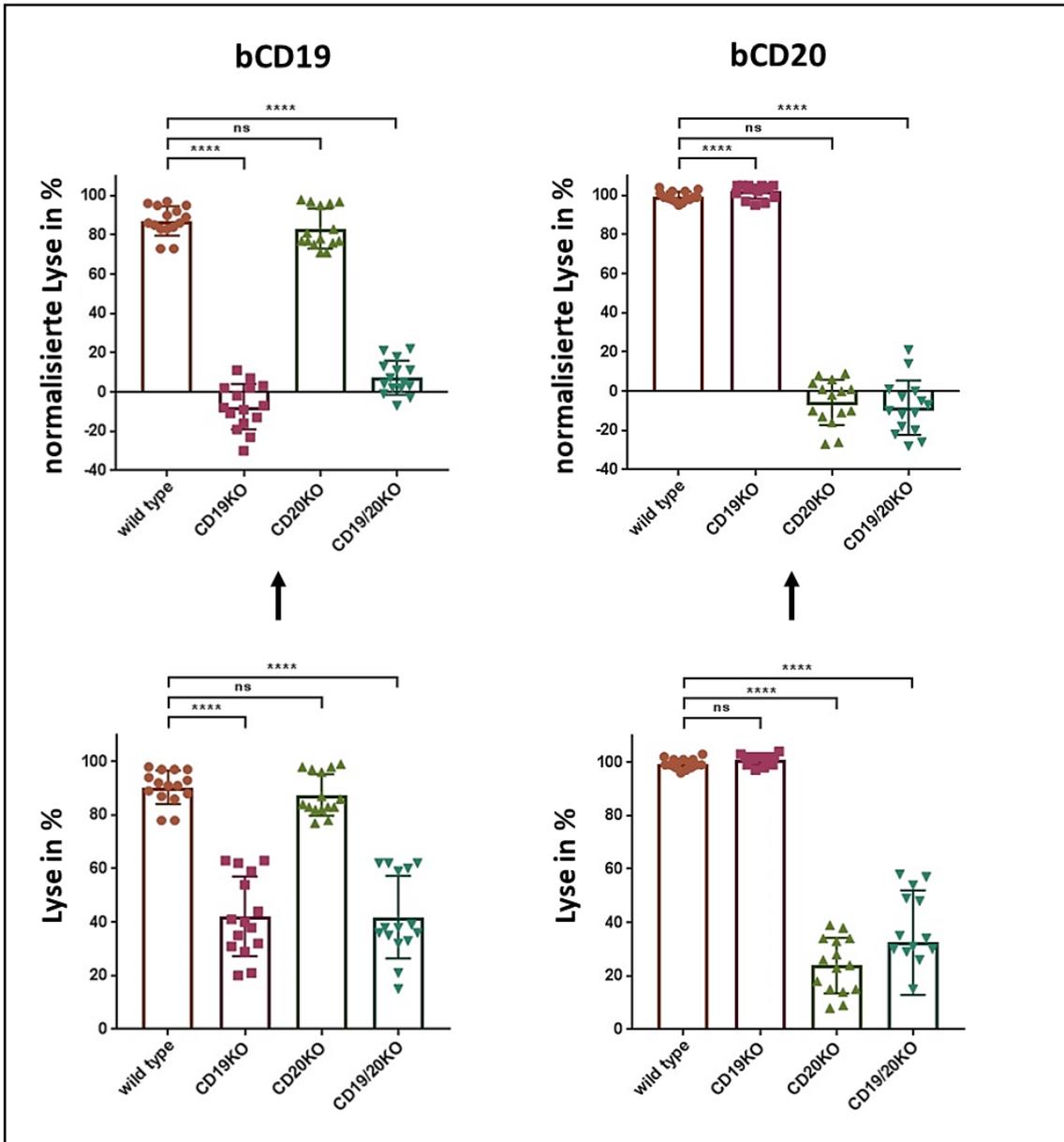


Abb. III-7 AdCAR-T-Zellen mit bCD19 und bCD20 vs. JeKo-1

Darstellung des Luciferase-basierten Kill-Assays mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 bzw. bCD20 vs. alle JeKo-1-Varianten. Die Messung erfolgte nach 12, 24 und 48 Stunden, wobei hier die nach 48 Stunden gemessenen Lysewerte aufgetragen sind; jeweils für die Antikörper bCD19 und bCD20 als reine Lyse (unten) sowie als bControl-normalisierte Lyse (oben).

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 1:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, One-way ANOVA mit Tukey-Test, $p < 0,0001$)

[Adaptiert aus dem Manuskript Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting]

Um die Ergebnisse aus dem vorigen Luciferase-basierten Kill-Assay zu reproduzieren und weiter zu visualisieren, wurde ein FACS-basierter Kill-Assay durchgeführt. Hierzu wurden drei Gesamtmessungen ($n\Sigma = 3$) vorgenommen, wobei die Ergebnisse aller Messungen vergleichbar waren. Die Tumorzellen JeKo-1 Wildtyp, CD19KO und CD20KO wurden jeweils mit AdCAR-T-Zellen und entweder dem Antikörper bCD19 oder bCD20 inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 48-Well-Platten über 48 Stunden. Auf die genaue Methodik und Gating-Strategie wurde bereits in Kapitel II eingegangen.

Bei JeKo-1 Wildtyp (CD19- und CD20-positiv) ergab sich im Vergleich zu den Negativkontrollen (nur mit JeKo-1 bzw. ohne Antikörper mit AdCAR-T-Zellen) eine deutliche Verminderung der Tumorzell-Population bei Zugabe beider biotinylierter Antikörper bCD19 und bCD20 (siehe *Abb. III-8*).

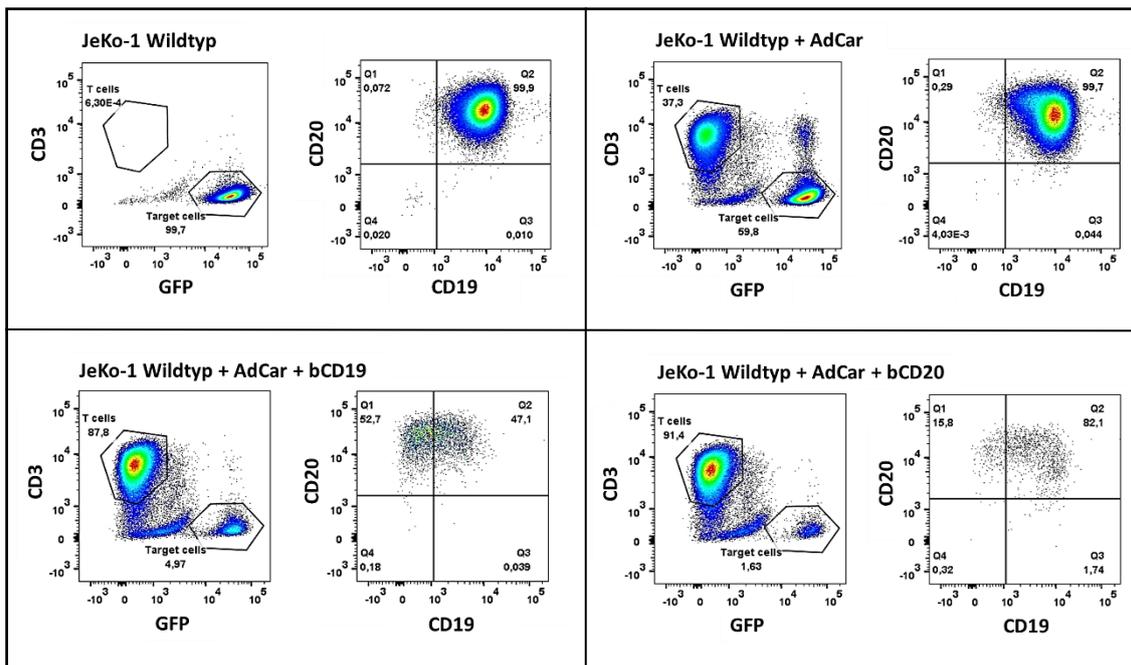


Abb. III-8 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 Wildtyp

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp. Zugegeben wurden die Antikörper bCD19 oder bCD20. Als Negativkontrollen dienten eine FACS-Analyse von JeKo-1 Wildtyp alleine und von JeKo-1 Wildtyp mit AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper.

($n\Sigma = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, Messung nach 48 Stunden)

Bei JeKo-1 CD19KO (CD19-negativ und CD20-positiv) blieb die Tumorzell-Population bei Zugabe des Antikörpers bCD19 vergleichbar mit den Negativkontrollen. Bei Zugabe des Antikörpers bCD20 ergab sich eine deutliche Verminderung der Tumorzell-Population (Abb. III-9). Im Vergleich dazu verhielten sich die Ergebnisse bei JeKo-1 CD20KO umgekehrt (Abb. III-10).

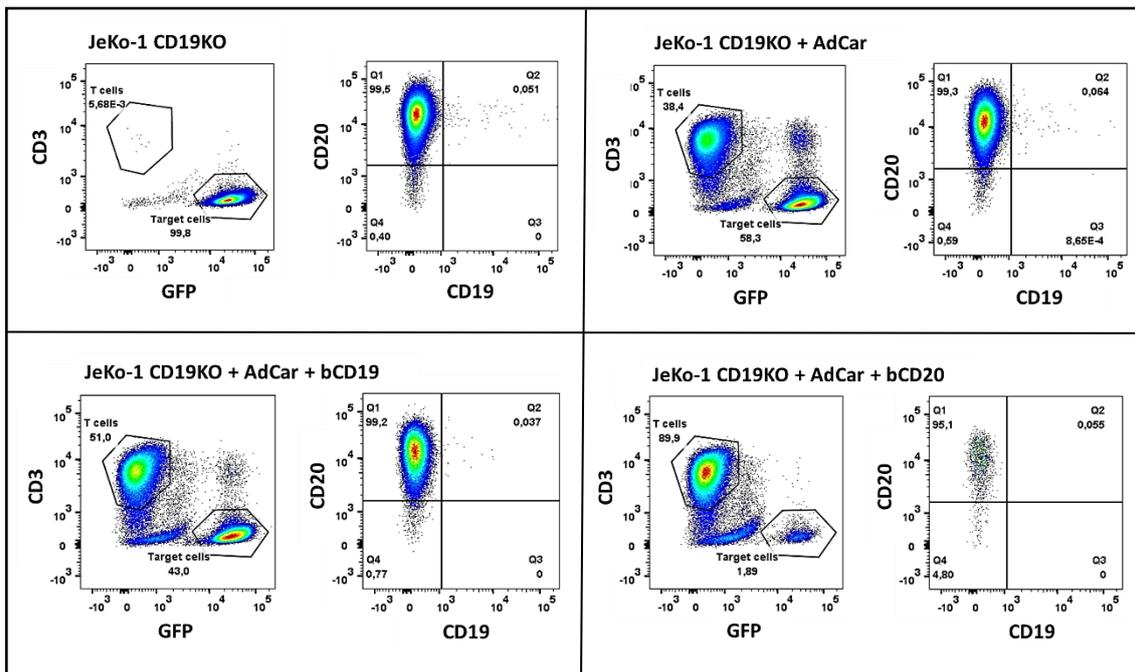


Abb. III-9 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 CD19KO

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 CD19KO. Zugegeben wurden die Antikörper bCD19 oder bCD20. Als Negativkontrollen dienten eine FACS-Analyse von JeKo-1 CD19KO alleine und von JeKo-1 CD19KO mit AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper. ($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, Messung nach 48 Stunden)

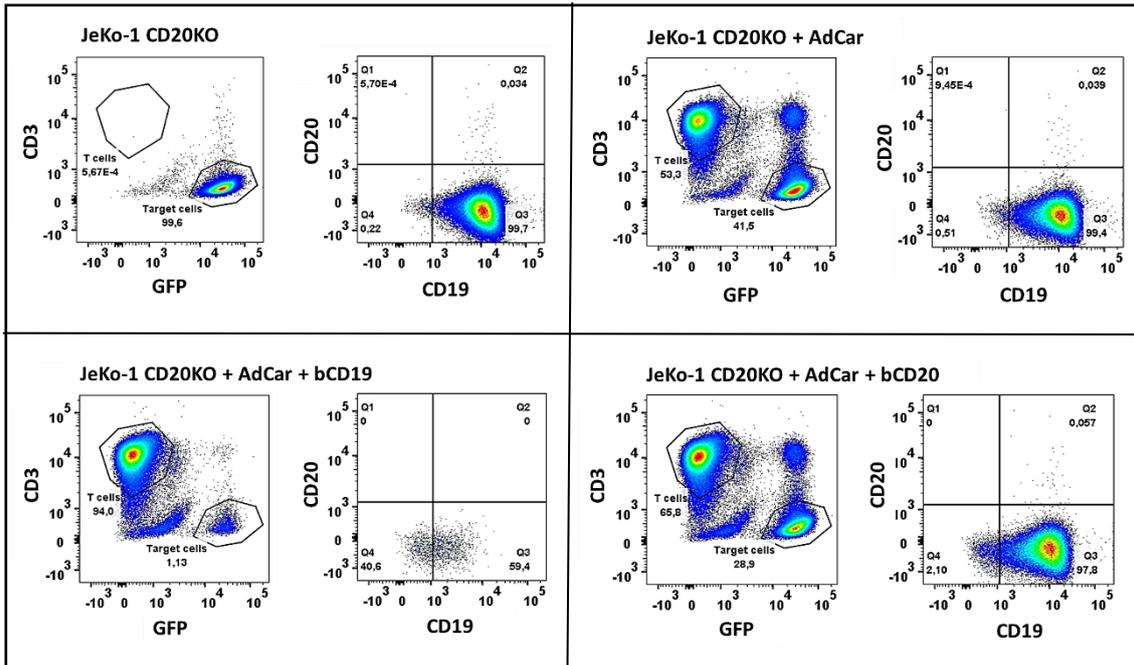


Abb. III-10 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 CD20KO

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 CD20KO. Zugegeben wurden die Antikörper bCD19 oder bCD20. Als Negativkontrollen dienten eine FACS-Analyse von JeKo-1 CD20KO alleine und von JeKo-1 CD20KO mit AdCAR-T-Zellen ohne Antikörper. ($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, Messung nach 48 Stunden)

3.2 Entwicklung der Lyse über die Zeit

Nun werden die verschiedenen Messzeitpunkte betrachtet. Über 48 Stunden konnte der Zeitverlauf der Lyse beobachtet werden, dargestellt sind hier die Zeitpunkte 12, 24 und 48 Stunden am Beispiel von JeKo-1 Wildtyp (siehe *Abb. III-11*).

Die 12-Stunden-Werte betragen bei allen Konditionen < 0 %, bei den 24-Stunden-Werten war die Lyse mit bCD19 35,2 %, mit bCD20 58,7 % und bei den Kontrollen < 5 %. Die 48-Stunden-Werte wurden bereits in Kapitel III.3.1 beschrieben und betragen für bCD19 90,4 %, für bCD20 99,4 % und für die Kontrollen < 30 %.

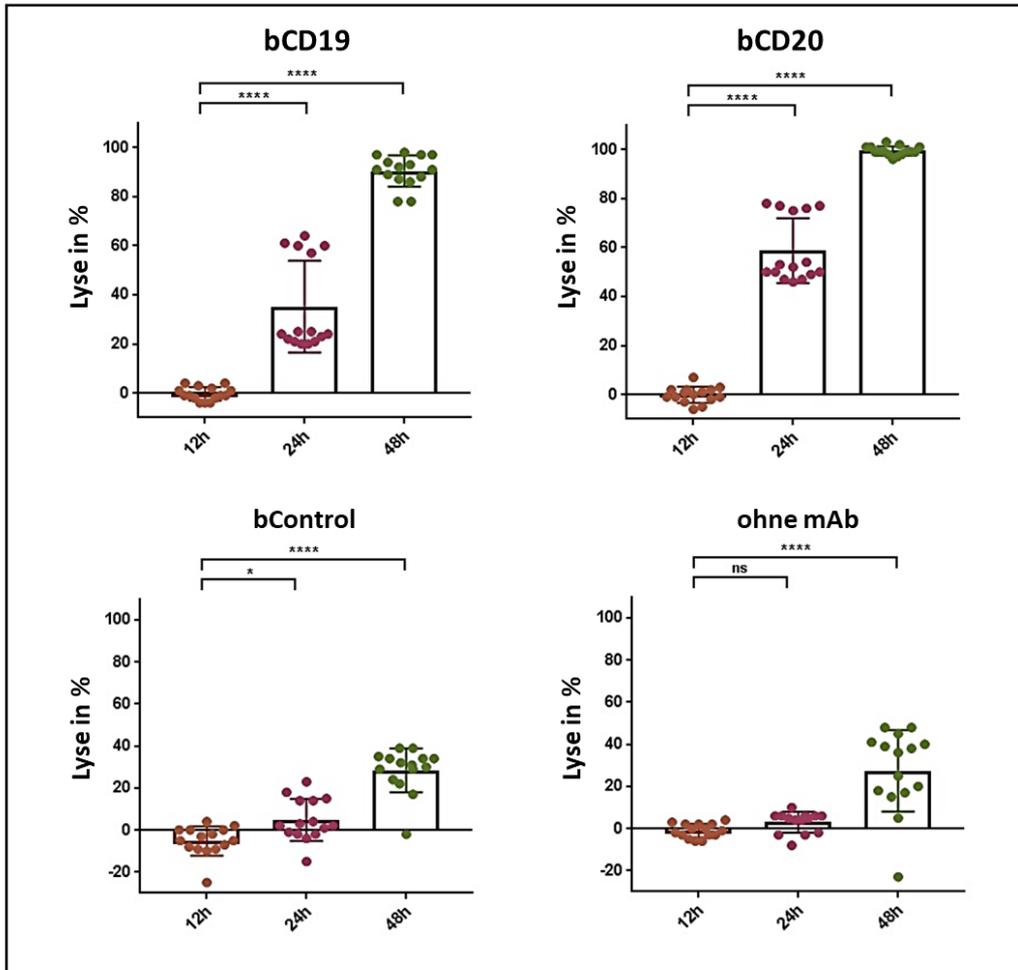


Abb. III-11 Entwicklung der Lyse über die Zeit

Darstellung des Luciferase-basierten Kill-Assays mit AdCAR-T-Zellen und biotinylierten Antikörpern vs. JeKo-1 Wildtyp. Die Messung erfolgte nach 12, 24 und 48 Stunden, die Lysewerte sind für alle Konditionen (bCD19, bCD20, bControl, ohne mAb) aufgetragen.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 1:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, One-way ANOVA mit Tukey-Test, $p < 0,0001$)

3.3 Vergleichbarkeit der AdCAR-T-Zellen verschiedener Spender

Auch wurden die AdCAR-T-Zellen verschiedener Spender im Hinblick auf eine vergleichbare Lyse untereinander verglichen. Die Spender waren gesund, männlich und gehörten der Altersgruppe 30 bis 40 Jahre an. Die Ergebnisse, aufgeschlüsselt nach Spendern, finden sich ebenfalls in Tabelle III-3.

Beispielhaft wird hier auf die Lysewerte eingegangen, die bei JeKo-1 Wildtyp erzielt wurden (siehe *Abb. III-12*). Mit den AdCAR-T-Zellen von D1 konnte mit bCD19 im Mittel eine reine Lyse von 83,4 %, mit den Zellen von D2 eine reine Lyse von 91,5 % und mit den Zellen von D3 eine reine Lyse von 96,4 % erreicht werden; die Standardabweichung betrug 6,4 %. Mit bCD20 betrug die reine Lyse im Mittel 97,5 %, 101,7 % bzw. 99,0 %, mit einer Standardabweichung von 2,0 %. Bei den Kontrollen mit Antikörper bControl betrugen die Lysewerte 18,8 %, 33,6 % und 33,1 %; ohne Antikörper lagen sie bei 31,8 %, 6,7 % und 44,0 %. Die Standardabweichungen waren hierbei 10,2 % bzw. 19,4 %.

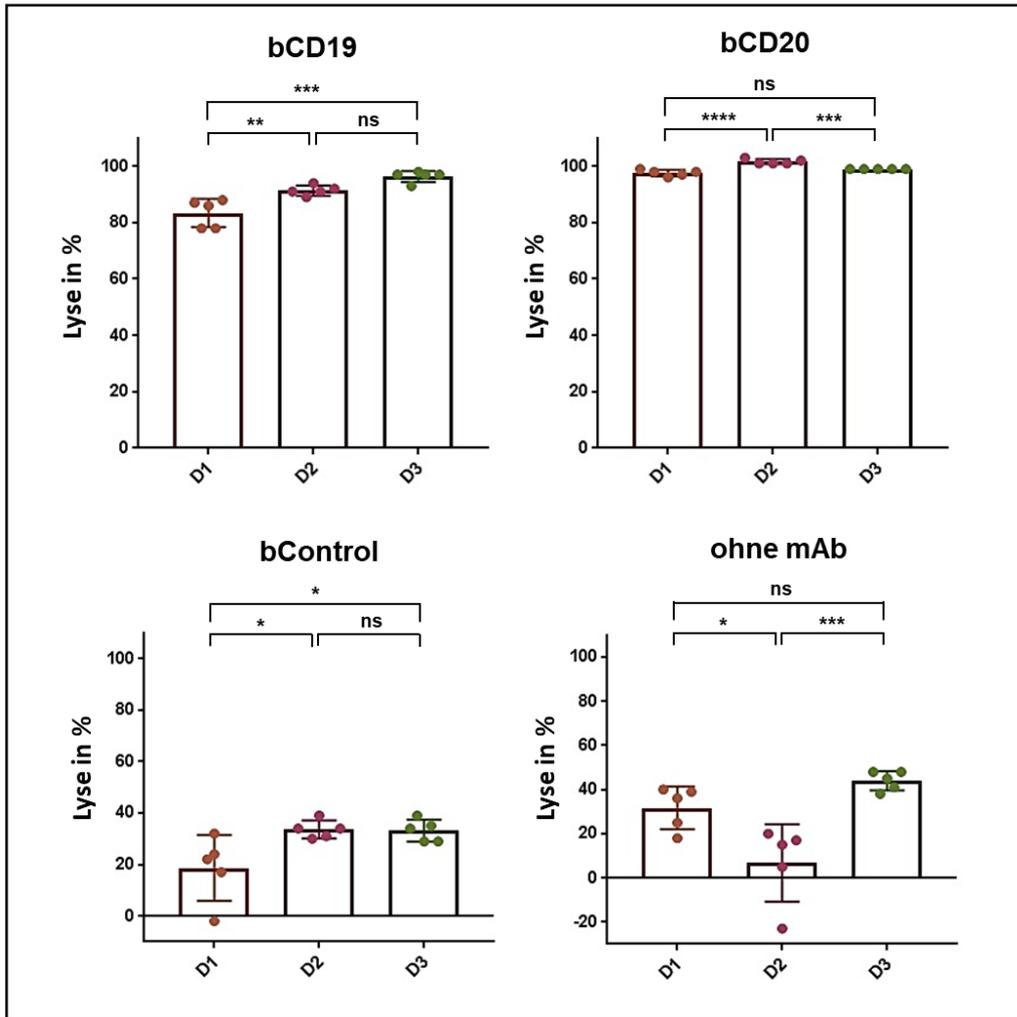


Abb. III-12 Vergleich der Lysewerte verschiedener Spender

Darstellung des 48-Stunden-Wertes des Luciferase-basierten Kill-Assays mit AdCAR-T-Zellen und biotinylierten Antikörpern vs. JeKo-1 Wildtyp. Die Ergebnisse sind aufgeschlüsselt nach Spendern, um die Vergleichbarkeit der AdCAR-T-Zellen verschiedener Spender evaluieren zu können.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 1:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, One-way ANOVA mit Tukey-Test, $p \leq 0,0001$)

4. Vergleich von AdCAR-T-Zellen und CD19-/GD2-CAR-T-Zellen

Als Nebenversuch wurde die Lyse von Tumorzellen durch AdCAR-T-Zellen mit der Lyse durch konventionelle CD19-CAR-T-Zellen und GD2-CAR-T-Zellen verglichen. Es sollte durch Luciferase-basierte Kill-Assays gezeigt werden, dass das Killing durch AdCAR-T-Zellen genauso spezifisch ist, wie das der konventionellen CAR-T-Zellen und es auch bei der unspezifischen Lyse keine großen Unterschiede gibt.

Als E:T-Ratio wurde auch hier 1:1 festgelegt. Die spezifischen Konditionen für den Luciferase-basierten Kill-Assay, dessen Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden, waren:

- JeKo-1 Wildtyp/CD19KO + CD19-CAR-T-Zellen
- JeKo-1 Wildtyp/CD19KO + GD2-CAR-T-Zellen

Die Ergebnisse werden mit denjenigen aus dem vorigen Kapitel verglichen. In der Ergebnistabelle (siehe *Tab. III-4*) werden zur Übersicht der Mittelwert der jeweils erzielten Lyse erneut den Mittelwerten aus dem vorigen Kapitel gegenübergestellt. Es wurden zwei Gesamtmessungen ($n\Sigma = 2$) durchgeführt, die sich aus jeweils 4 Einzelmessungen zusammensetzen, womit sich eine Gesamtzahl von 8 Einzelmessungen ($n = 8$) pro Kondition ergibt. Die Inkubation erfolgte, wie im vorigen Versuch, ebenfalls in 96-Well-Platten über 48 Stunden und die Messung zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 Stunden.

Tab. III-4 Übersicht der Ergebnisse der Kill-Assays zum Vergleich konventioneller CAR-T-Zellen mit AdCAR-T-Zellen

| | CD19-CAR | GD2-CAR | AdCAR + bCD19 | AdCAR + bControl | AdCAR ohne bmAb |
|-----------------------|----------|---------|---------------|------------------|-----------------|
| JeKo-1 Wildtyp | 99,3 % | 23,3 % | 90,4 % | 28,5 % | 27,5 % |
| JeKo-1 CD19KO | 4,4 % | 15,9 % | 42,2 % | 45,7 % | 24,1 % |

Alle JeKo-1-Varianten sind GD2-negativ, was durch ein früheres Antigen-Screening der Arbeitsgruppe bereits bekannt war. Bei JeKo-1 Wildtyp wurde mit konventionellen CD19-CAR-T-Zellen im Mittel eine Lyse von 99,3 % und mit AdCAR-T-Zellen plus bCD19 eine Lyse von 90,4 % erreicht. Die unspezifische Lyse durch konventionelle GD2-CAR-T-Zellen betrug im Mittel 23,3 %, während die unspezifische Lyse durch AdCAR-T-Zellen plus bControl bei 28,5 % und durch AdCAR-T-Zellen ohne mAb bei 27,5 % lag. Bei der Zellvariante JeKo-1 CD19KO betrug die unspezifischen Lysewerte bei den konventionellen CD19-CAR-T-Zellen und GD2-CAR-T-Zellen 4,4 % bzw. 15,9 %, während sie bei den AdCAR-T-Zellen mit bCD19, bControl und ohne mAb bei 45,2 %, 45,7 % und 24,1 % lag (siehe *Abb. III-13*).

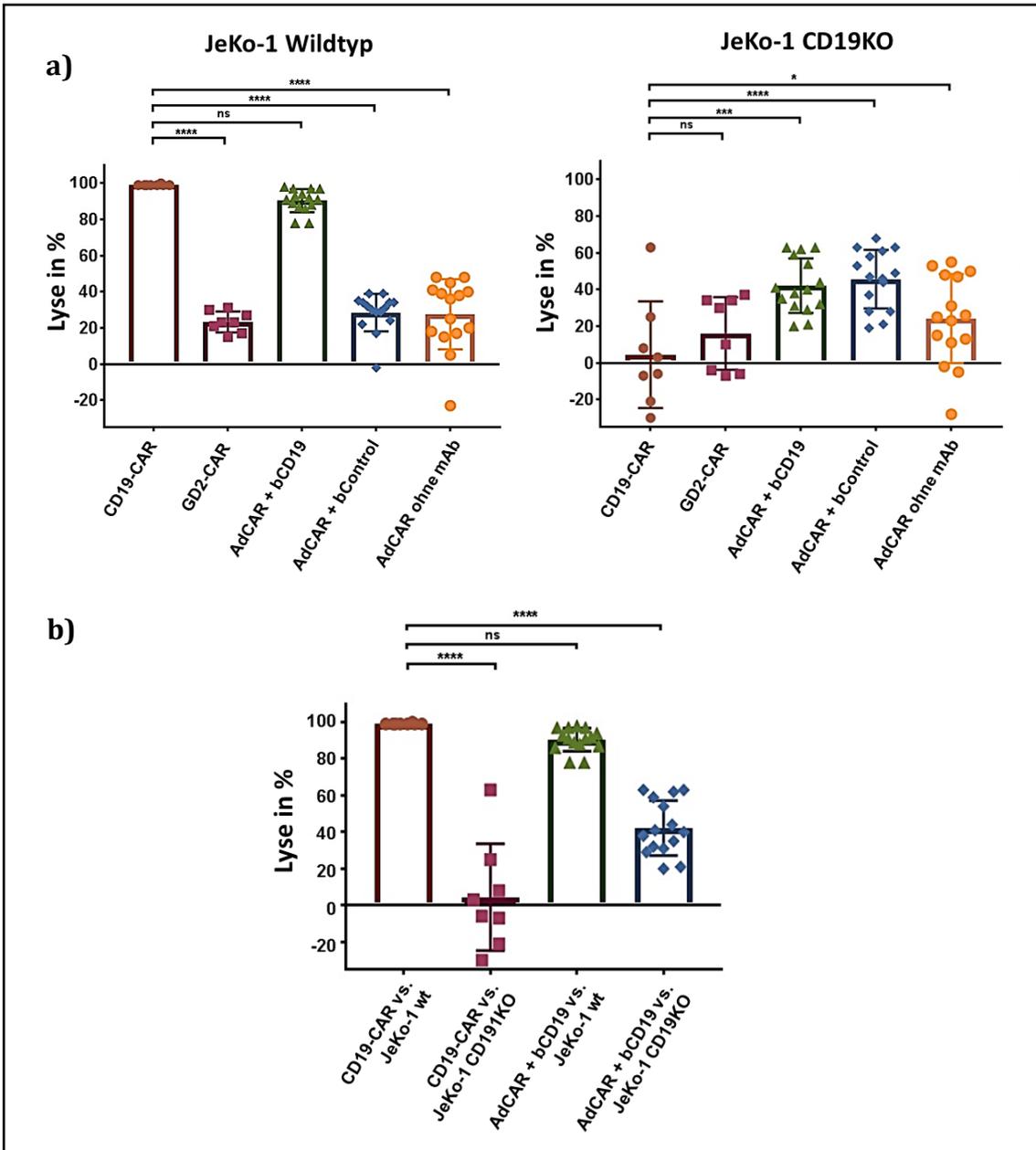


Abb. III-13 Vergleich konventioneller CAR-T-Zellen mit AdCAR-T-Zellen
a) Verschiedene CAR-Arten vs. JeKo-1 Wildtyp und JeKo-1 CD19KO
b) Darstellung mit Fokus auf CD19 als Target-Antigen

a) Vergleich des 48-Stunden-Wertes folgender Luciferase-basierter Kill-Assays: JeKo-1 Wildtyp und JeKo-1 CD19KO jeweils gegen CD19- und GD2-CAR-T-Zellen ($n_{\Sigma} = 2$) sowie gegen AdCAR-T-Zellen mit bCD19 bzw. Kontrollen

b) Dieselben Werte in anderer Darstellung mit Fokus auf CD19 als Target-Antigen.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 1:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, One-way ANOVA mit Tukey-Test, $p < 0,0001$)

5. *Flexibilität* mit kombiniertem Targeting bei Antigenverlust

In den folgenden beiden Versuchen wurden die verschiedenen JeKo-1-Varianten dazu genutzt, Therapieversagen durch Antigenverlust zu simulieren, und wie sich die Kombinationen von zwei oder mehr biotinylierten Antikörpern mit AdCAR-T-Zellen auf diese Situation auswirken. Es sollte durch Luciferase-basierte und FACS-basierte Kill-Assays gezeigt werden, dass kombinatorisches Targeting einen wirkungsvollen Therapieansatz bei Therapieversagen durch Antigenverlust darstellt.

Im Luciferase-basierten Kill-Assay waren die spezifischen Konditionen, die mit den Lysewerten der einzeln verwendeten biotinylierten Antikörpern verglichen wurden:

- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19 + bCD20
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19 + bCD20 + bROR1
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bControl
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen ohne mAb

In den FACS-basierten Kill-Assays entsprachen die Konditionen zum großen Teil denjenigen aus den Luciferase-basierten Kill-Assays:

- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD20
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19 + bCD20
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen + bCD19 + bCD20 + bROR1
- JeKo-1-Variante + AdCAR-T-Zellen ohne mAb
- JeKo-1-Variante allein

5.1 Multiples Targeting im Luciferase-basierten Kill-Assay

In der Ergebnistabelle (siehe *Tab. III-5*) werden zur Übersicht die Lysewerte der jeweiligen Kondition dargestellt. Es wurden drei Gesamtmessungen ($n\Sigma = 3$) durchgeführt, die sich aus jeweils 9 Einzelmessungen zusammensetzen, womit sich eine Gesamtzahl von 27 Einzelmessungen ($n = 27$) pro Kondition ergibt. Die Inkubation erfolgte, wie in den vorigen Versuchen, ebenfalls in 96-Well-Platten über 48 Stunden und die Messung fand zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 Stunden statt.

Tab. III-5 Ergebnisse des Kill-Assays mit den Kombinationen aus bCD19, bCD20 und bROR1: Reine Lyse nach 48h

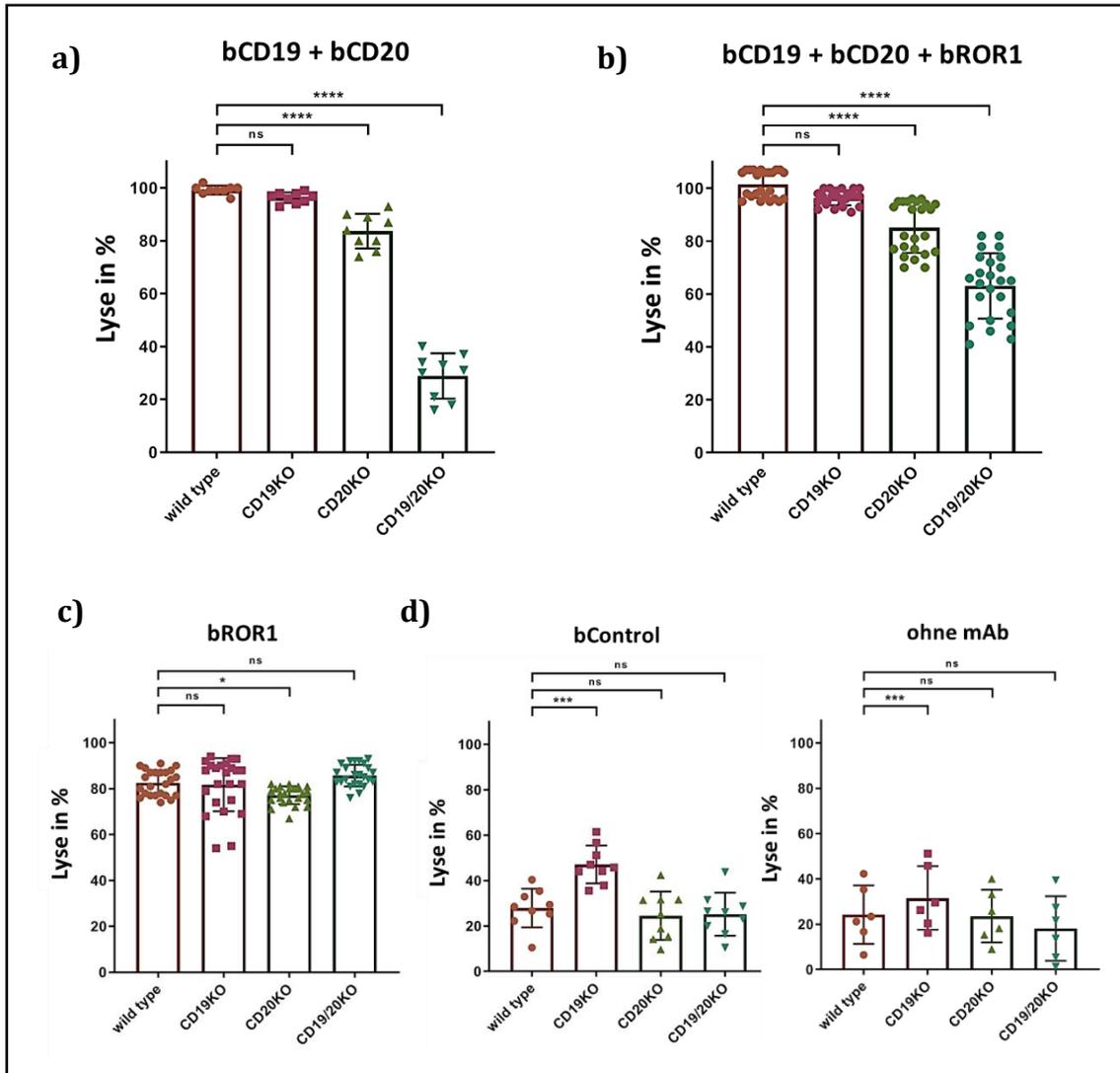
| JeKo-1 wt | MW | SD |
|-------------------------|-----------|-----------|
| bROR1 | 82,6 % | 3,4 % |
| bCD19 + bCD20 | 99,1 % | 1,7 % |
| bCD19 + bCD20 + bROR1 | 101,5 % | 5,7 % |
| bControl | 27,9 % | 8,6 % |
| ohne mAb | 24,2 % | 12,9 % |
| JeKo-1 CD19KO | | |
| bROR1 | 81,8 % | 9,9 % |
| bCD19 + bCD20 | 96,2 % | 2,1 % |
| bCD19 + bCD20 + bROR1 | 96,4 % | 2,7 % |
| bControl | 39,4 % | 15,7 % |
| ohne mAb | 21,7 % | 18,7 % |
| JeKo-1 CD20KO | | |
| bROR1 | 77,2 % | 1,9 % |
| bCD19 + bCD20 | 82,3 % | 6,4 % |
| bCD19 + bCD20 + bROR1 | 85,1 % | 10,4 % |
| bControl | 24,5 % | 10,6 % |
| ohne mAb | 23,6 % | 11,7 % |
| JeKo-1 CD19/20KO | | |
| bROR1 | 85,7 % | 1,1 % |
| bCD19 + bCD20 | 28,9 % | 8,5 % |
| bCD19 + bCD20 + bROR1 | 63,2 % | 11,2 % |
| bControl | 25,2 % | 9,5 % |
| ohne mAb | 18,1 % | 14,3 % |

Durch die Kombination der beiden Antikörper bCD19 und bCD20 (jeweils in der vollen Konzentration von 10 ng/ml, d. h. die totale Antikörper-Konzentration betrug nun 20 ng/ml) wurden für die JeKo-1-Varianten Wildtyp, CD19KO und CD20KO suffiziente Lysewerte von durchschnittlich 99,1 %, 96,2 % bzw. 82,3 % erreicht. Bei JeKo-1 CD19/20KO betrug die Lyse im Mittel 28,9 % (siehe *Abb. III-14a*).

Durch die Kombination der drei Antikörper bCD19, bCD20 und bROR1 (ebenfalls in der vollen Konzentration von 10 ng/ml, d. h. die totale Antikörper-Konzentration betrug hier 30 ng/ml) wurden für die JeKo-1 Varianten Wildtyp, CD19KO und CD20KO ausreichende Lysen von 101,5 %, 96,4 % bzw. 85,1 % erzielt. Bei JeKo-1 CD19/20KO betrug die Lyse im Mittel 63,2 % (siehe *Abb. III-14b*).

Mit dem alternativen Antikörper bROR1 alleine (Konzentration 10 ng/ml), dessen Expression vorab getestet wurde (vgl. Kapitel 3.I.2) wurde für alle JeKo-1-Varianten eine Lyse von 77,2 % bis 85,7 % erreicht (siehe *Abb. III-14c*).

Die Kontrollen bControl und ohne mAb lagen im Vergleich bei 24,5 % bis 39,4 % bzw. 18,1 % bis 24,2 % (siehe *Abb. III-14d*).



**Abb. III-14 Lyse von JeKo-1 durch Kombination mehrerer Antikörper
a) zwei Antikörper b) drei Antikörper c) alternativer Antikörper d) Kontrollen**

Darstellung des Luciferase-basierten Kill-Assays mit AdCAR-T-Zellen und Antikörper-Kombinationen, jeweils vs. alle vier JeKo-1-Varianten. Die Messung erfolgte nach 12, 24 und 48 Stunden, wobei hier die nach 48 Stunden gemessenen Lysewerte aufgetragen sind. a) Kombination von bCD19 und bCD20, b) Kombination von bCD19, bCD20 und bROR1, c) der alternative Antikörper bROR1 alleine, d) Kontrollen: unspezifische Antikörper bControl sowie Kondition ohne Antikörper.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 1:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, One-way ANOVA mit Tukey-Test, $p < 0,001$)

5.2 Multiples Targeting im FACS-basierten Kill-Assay

In FACS-basierten Kill-Assays sollten erneut die Ergebnisse aus den vorigen Luciferase-basierten Kill-Assays reproduziert und in anderer Form visualisiert werden. Hierzu wurden drei Gesamtmessungen ($n\Sigma = 3$) durchgeführt, wobei die Ergebnisse aller Messungen vergleichbar waren. Die Inkubation erfolgte in 48-Well-Platten über 48 Stunden. Die verwendeten Zellzahlen wurden entsprechend angepasst, auf die genaue Methodik wurde bereits in Kapitel II.2.6 eingegangen.

Zum Verständnis wird in Abbildung III-15 die Verteilung der JeKo-1-Varianten im FACS-Plot gezeigt.

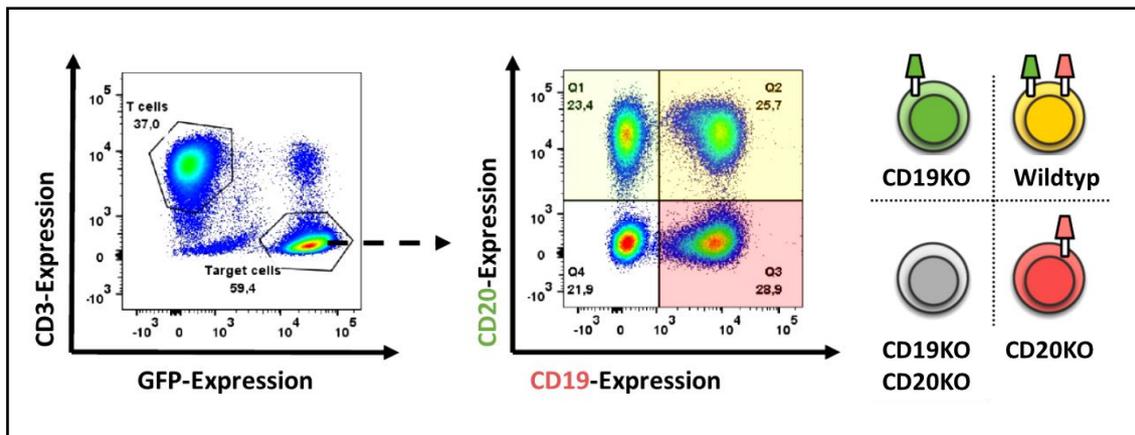


Abb. III-15 Verteilung der JeKo-1-Varianten im FACS-Plot

Die Populationen der CAR-T-Zellen und JeKo-1-Zellen wurden zunächst nach CD3- und GFP-Expression aufgetrennt, die Aufschlüsselung der vier JeKo-1-Varianten Wildtyp, CD19KO, CD20KO und CD19KO/CD20KO erfolgte anschließend in einem Vier-Felder-Plot.

[Adaptiert aus dem Manuskript Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – *Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*]

In Abbildung III-16 sind die Ergebnisse als mögliche Eskalationsschritte einer Therapie mit AdCAR-T-Zellen dargestellt. Alle vier JeKo-1-Varianten wurden im selben Verhältnis gemischt und sind im CD19/CD20-Plot als vier Populationen abgrenzbar. Als Negativkontrollen wurden zuallererst FACS-Analysen der JeKo-1-Varianten allein sowie mit AdCAR-T-Zellen (ohne Antikörperzugabe) durchgeführt; bei letzterer war keine Veränderung der JeKo-1-Populationen erkennbar.

Der erste Schritt war die Zugabe eines einzelnen Antikörpers. Sowohl mit bCD19 als auch mit bCD20 war eine deutliche Abnahme der entsprechenden Antigen-positiven JeKo-1-Populationen erkennbar, während die Antigen-negativen Populationen selektiert wurden. Das Gesamtüberleben der JeKo-1-Populationen im Vergleich zur Kontrolle ohne bmAb betrug durchschnittlich 23,3 % bzw. 24,8 %. Der zweite Schritt beinhaltete die Zugabe der Antikörperkombination aus bCD19 und bCD20. Nun waren die drei antigentragenden JeKo-1-Populationen Wildtyp, CD19KO und CD20KO merklich verkleinert, während die CD19KO/CD20KO-Population selektiert wurde. Das Gesamtüberleben betrug hierbei noch durchschnittlich 12,6 %. In der anschließenden Testung der Dreifachkombination aus bCD19, bCD20 und bROR1 blieben noch 3,7 % der Zellen übrig (siehe *Abb. III-16*).

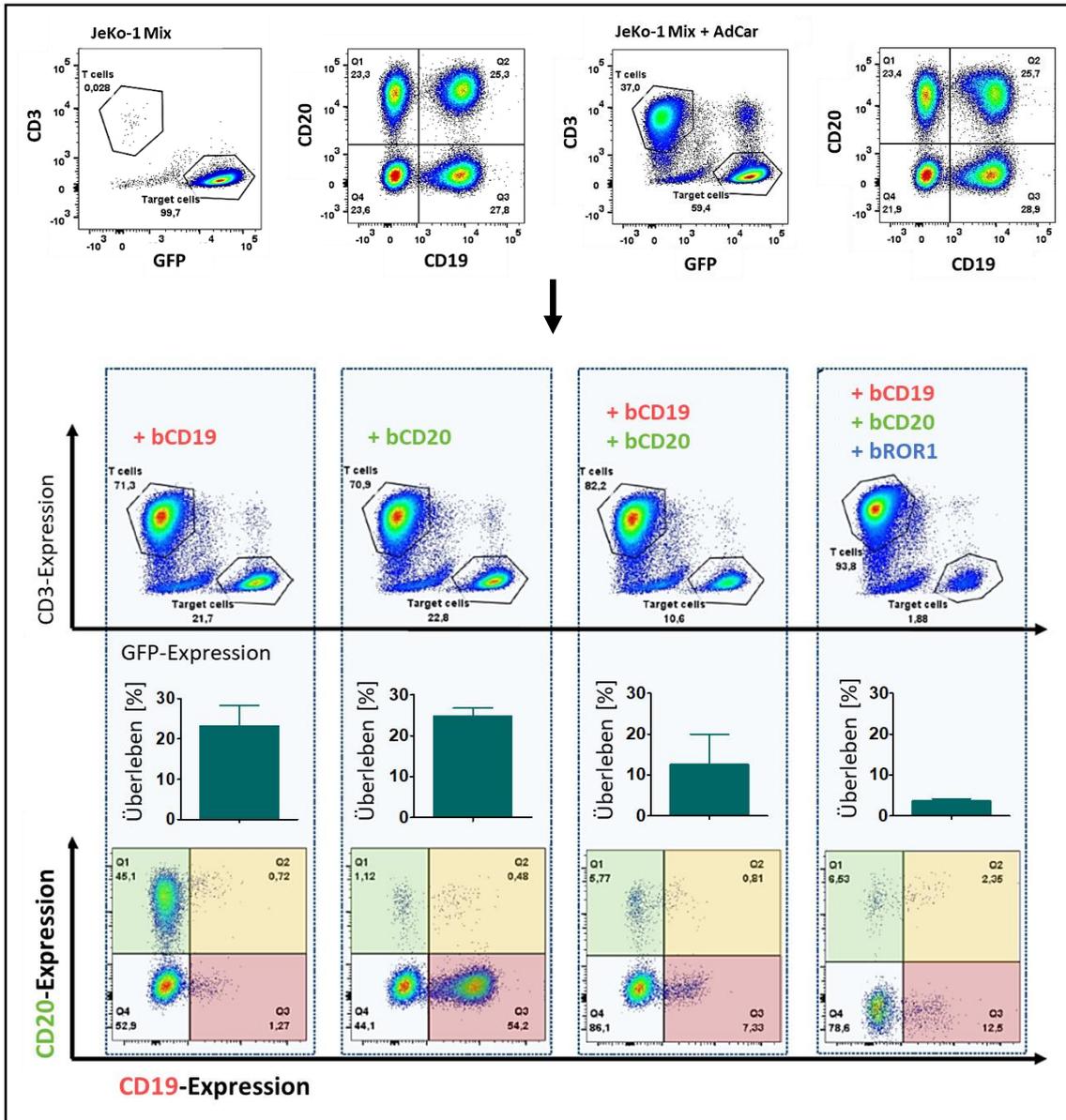


Abb. III-16 FACS-basierter Kill-Assay mit Antikörper-Kombinationen

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. alle vier JeKo-1-Varianten im 1:1:1:1-Mischverhältnis. Oben dargestellt sind die Kontrollen ohne CAR-T-Zellen bzw. ohne bmAb. Unterhalb davon befinden sich die möglichen Antikörper-Kombinationen bzw. Eskalationsschritte der AdCAR-T-Zell-Therapie: Zugabe eines Einzelantikörpers (bCD19 oder bCD20), einer Zweierkombination (bCD19 + bCD20) oder einer Dreierkombination (bCD19 + bCD20 + bROR1). Der Balken gibt das Überleben der JeKo-1-Population im Vergleich zur Kontrolle ohne bmAb an.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10ng/ml, Messung nach 48 Stunden)

[Adaptiert aus dem Manuskript Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting]

5.3 Sequenzielles Targeting im FACS-basierten Kill-Assay

In einem weiteren FACS-basierten Kill-Assay erfolgte ein ähnlicher Versuchsaufbau wie bei dem Versuch im vorigen Kapitel. Allerdings wurden die Antikörper nun sequenziell nach 48 Stunden Abstand hinzugegeben, um die Tumorzell-Populationen schrittweise zu eliminieren. Es wurden auch hier drei Gesamtmessungen ($n\Sigma = 3$) durchgeführt, wobei die Ergebnisse aller Messungen vergleichbar waren. Die Inkubation erfolgte in 48-Well-Platten über insgesamt 96 Stunden.

Die beiden JeKo-1-Varianten Wildtyp und CD20KO wurden im 1:1-Verhältnis gemischt und mit einer E:T-Ratio von 2:1 mit AdCAR-T-Zellen inkubiert. Bei der Hälfte der Proben wurde der Antikörper bCD20 hinzugefügt. Nach 48 Stunden erfolgte die erste FACS-Analyse. Bei den Proben mit Antikörper zeigte sich eine deutliche Abnahme der CD19- und CD20-positiven Wildtyp-Population. Die Negativkontrollen ohne Antikörper blieben im Vergleich weitestgehend unverändert. Nun wurde in die Hälfte der bereits mit bCD20 vorbehandelten Proben der Antikörper bCD19 zugegeben. Nach wiederum 48 Stunden (also insgesamt 96 Stunden) erfolgte die nächste FACS-Analyse. Während bei den Negativkontrollen die CD20KO-Population noch vorhanden war, wurde sie in der behandelten Probe weitestgehend ausgelöscht (siehe *Abb. III-17*).

Der gleiche Versuch wurde analog mit der Mischung JeKo-1 Wildtyp und CD19KO durchgeführt (siehe *Abb. III-18*).

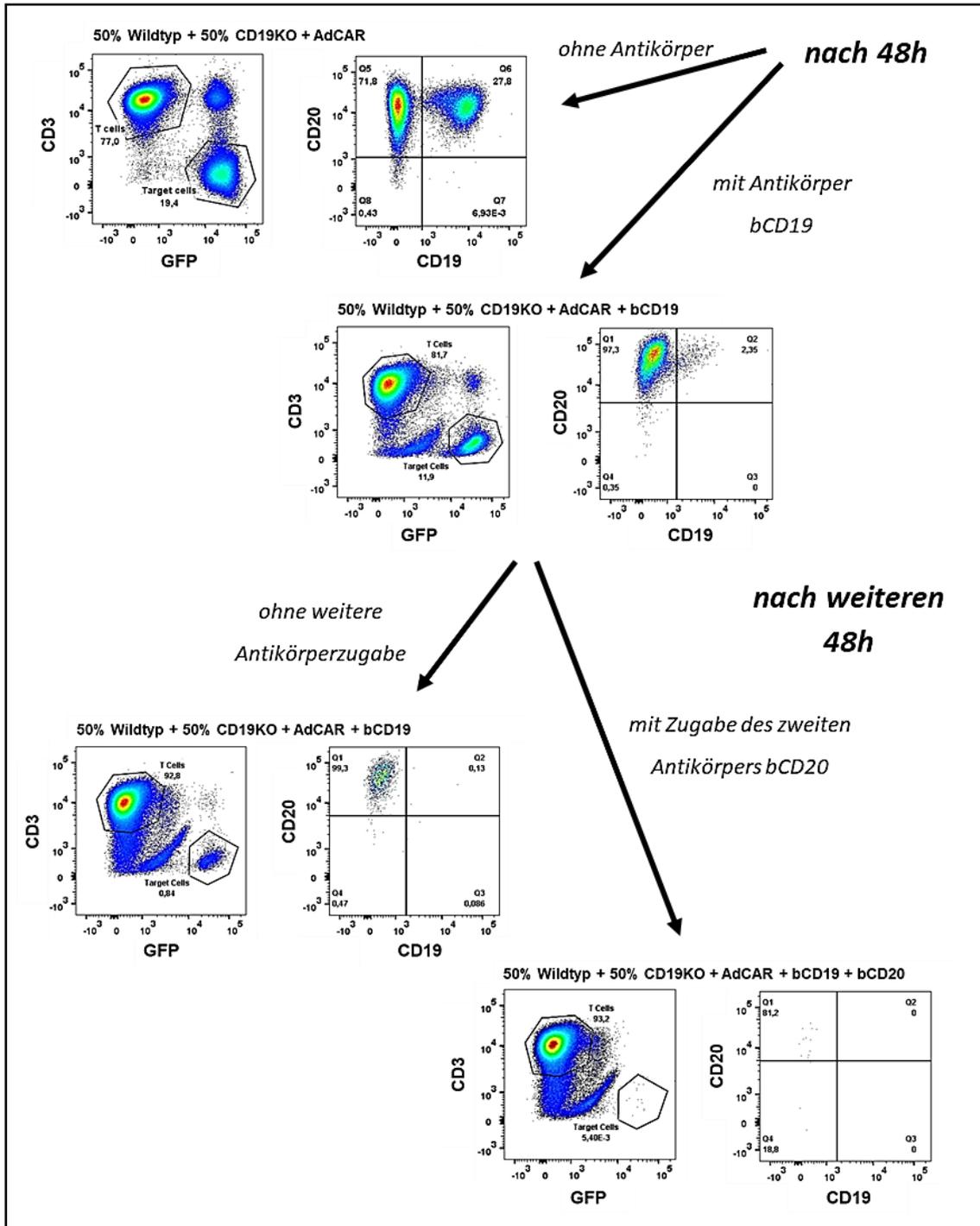


Abb. III-17 Schrittweise Elimination von Tumorzell-Populationen im FACS-basierten Kill-Assay mit JeKo-1 Wildtyp und CD19KO

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp und JeKo-1 CD19KO im 1:1-Mischverhältnis. Zunächst wurde der Antikörper bCD19 zugegeben, nach 48 Stunden erfolgte die Analyse. Anschließend wurde der zweite Antikörper bCD20 zugegeben und wieder 48 Stunden gewartet. Nach insgesamt 96 Stunden erfolgte dann die zweite Analyse.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, Messung nach 48 und 96 Stunden)

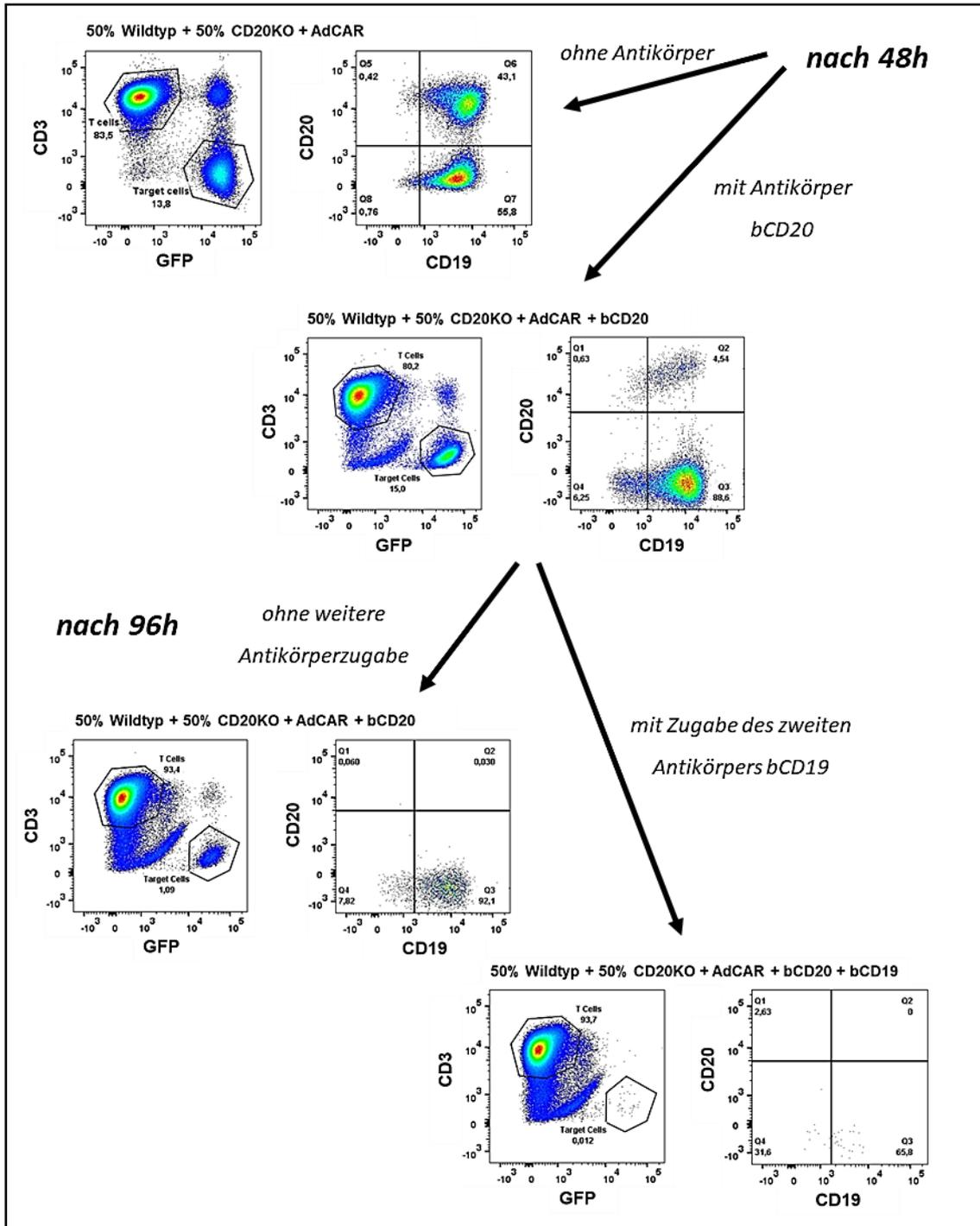


Abb. III-18 Schrittweise Elimination von Tumorzell-Populationen im FACS-basierten Kill-Assay mit JeKo-1 Wildtyp und CD20KO

FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp und JeKo-1 CD20KO im 1:1-Mischverhältnis. Zunächst wurde der Antikörper bCD20 zugegeben, nach 48 Stunden erfolgte die Analyse. Anschließend wurde der zweite Antikörper bCD19 zugegeben und wieder 48 Stunden gewartet. Nach insgesamt 96 Stunden erfolgte dann die zweite Analyse.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, mAb-Konzentration 10 ng/ml, Messung nach 48 und 96 Stunden)

6. *Selektivität durch kombiniertes unterschwelliges Targeting*

In diesen Versuchen wurde zunächst getestet, ob zur Aktivierung von AdCAR-T-Zellen eine bestimmte Schwellenkonzentration bzw. mAb-Dichte auf der Oberfläche der Zielzelle erforderlich ist. Anschließend wurde überprüft, ob diese Schwellenkonzentration nicht nur durch die Gabe eines einzelnen Antikörpers, z. B. bCD19 (siehe *Abb. III-19b.1*), sondern auch durch die Kumulation verschiedener Antikörper, z. B. bCD19 + bCD20 + bROR1 (siehe *Abb. III-19b.2*), erreicht werden kann. Letzteres wird als ‚Oberflächenaktivierungsmatrix‘ (Surface Activation Matrix = SAM) bezeichnet (siehe *Abb. III-19a*).

In den folgenden Versuchen wurde zunächst ein Cut-Off-Wert der Antikörperkonzentration ermittelt, ab welchem ein deutlicher Abfall der Lyse festzustellen ist. Anschließend wurden die biotinylierten Antikörper in verschiedenen Konzentrationen unterhalb des Cut-Off-Werts als ‚SAM‘ kombiniert, sodass insgesamt wieder eine Antikörper-Konzentration oberhalb des Cut-Off-Werts erreicht wurde.

Ziel dieser Versuche war es zu zeigen, dass eine Kombination von Antikörpern in unterschweligen Konzentrationen (die also einzeln nicht mehr zu einer Lyse führen würden), Zellen, die alle verwendeten Antigene tragen, dennoch von den AdCAR-T-Zellen lysiert werden können. Körperzellen, die nur eines der Target-Antigene tragen, bleiben so von der Therapie verschont, während die Tumorzellen eliminiert werden.

Bei der Antikörper-Titration Teil 1 erfolgte ein Luciferase-basierter Kill-Assay mit JeKo-1 Wildtyp, AdCAR-T-Zellen und den Antikörper-Konzentrationen 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml und 100 fg/ml, jeweils mit bCD19, bCD20 und bROR1. Zwischen 100 pg/ml und 10 pg/ml erfolgte bei allen Antikörpern ein deutlicher Abfall der Lysewerte auf < 5 % (siehe *Abb. III-20*).

Bei der Antikörper-Titration Teil 2 erfolgte nun ein Luciferase-basierter Kill-Assay mit den Antikörper-Konzentrationen 100 pg/ml bis 10 pg/ml, schrittweise abzüglich 10 pg/ml. Der Cut-Off erfolgte bei 20 pg/ml (< 20 % Lyse) (siehe *Abb. III-21*).

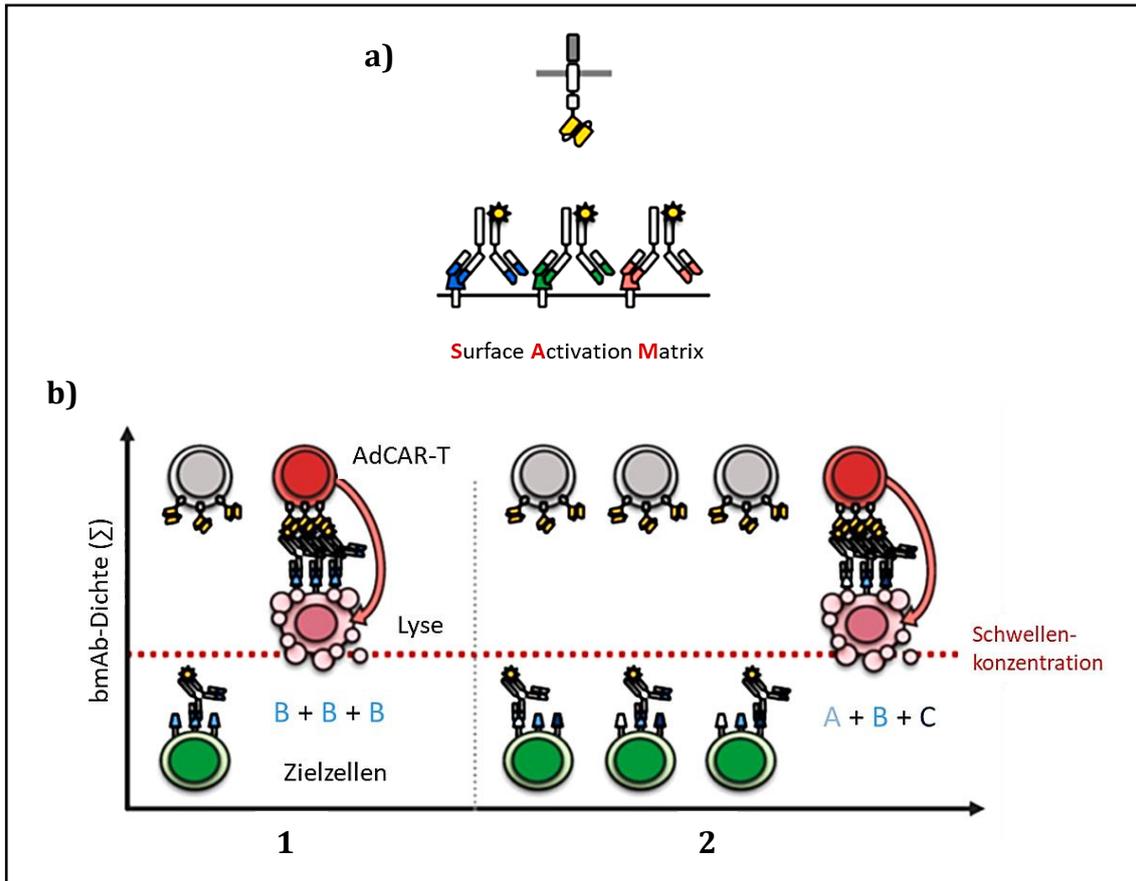


Abb. III-19 Aktivierung der AdCAR-T-Zellen mittels Surface Activation Matrix

a) Surface Activation Matrix: Der universelle AdCAR bindet unabhängig vom verwendeten biotinylierten Antikörper an die Oberfläche der Zielzelle. Aus diesem Grund können mehrere verschiedene Antikörper in unterschwelliger Konzentration zusammen die Schwellenkonzentration für die AdCAR-Aktivierung überschreiten.

b) Die Schwellenkonzentration kann entweder mit einem einzelnen Antikörper B, z. B. bCD19 (1) überschritten werden oder durch die Kombination verschiedener Antikörper A + B + C, z. B. bCD19 + bCD20 + bROR1, in einer Konzentration, die alleine nicht zur AdCAR-Aktivierung ausreichen würde (2).

[Adaptiert aus dem Manuskript *Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*]

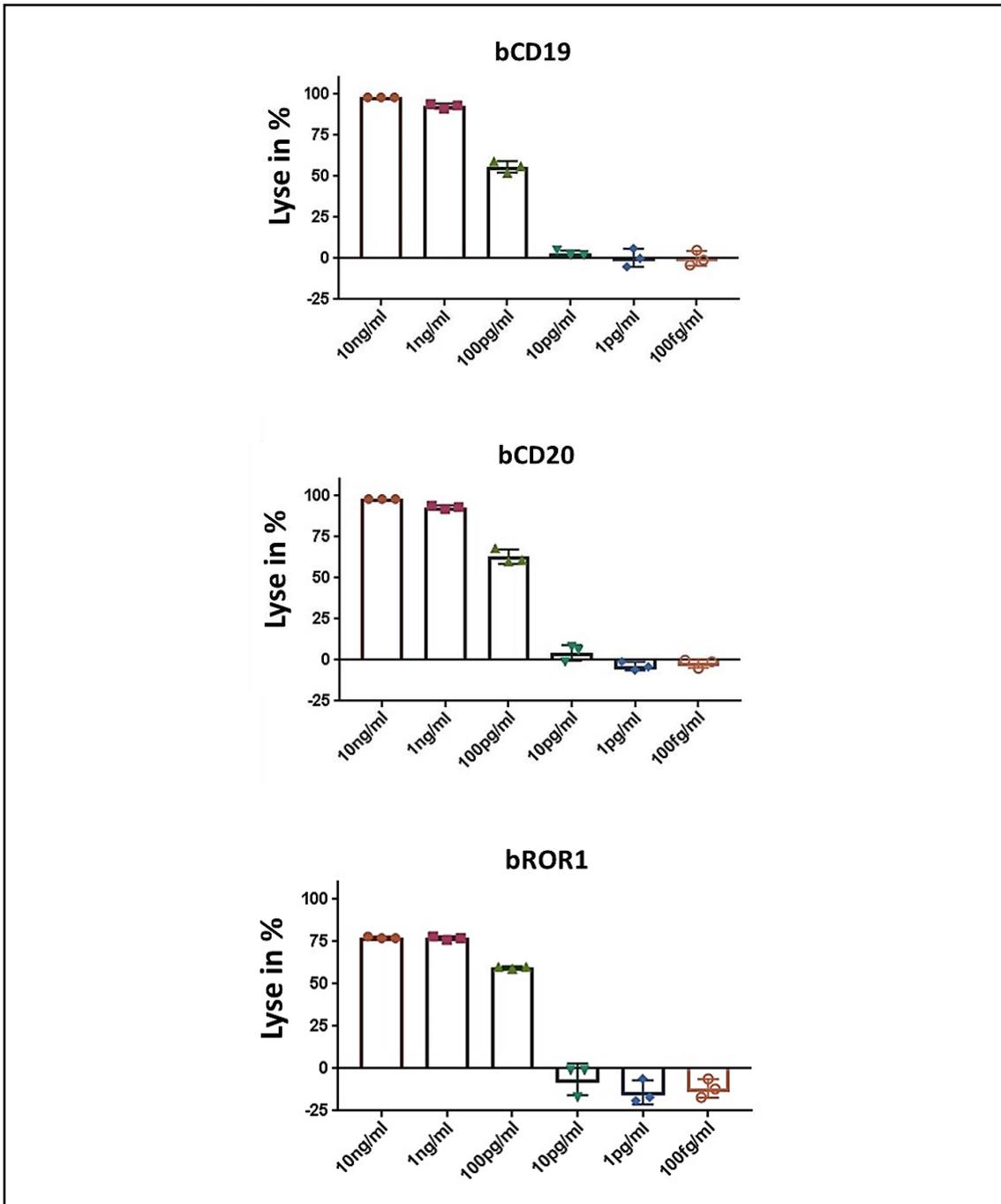


Abb. III-20 Antikörper-Titration Teil 1

Luciferase-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp. Es erfolgte eine Titration der biotinylierten Antikörper bCD19, bCD20 und bROR1 mit den Antikörper-Konzentrationen 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml und 100 fg/ml. Ein deutlicher Cut-Off der Lysewerte ist zwischen 100 pg/ml und 10 pg/ml erkennbar. (n_Σ = 1, E:T 2:1, Messung nach 48 Stunden)

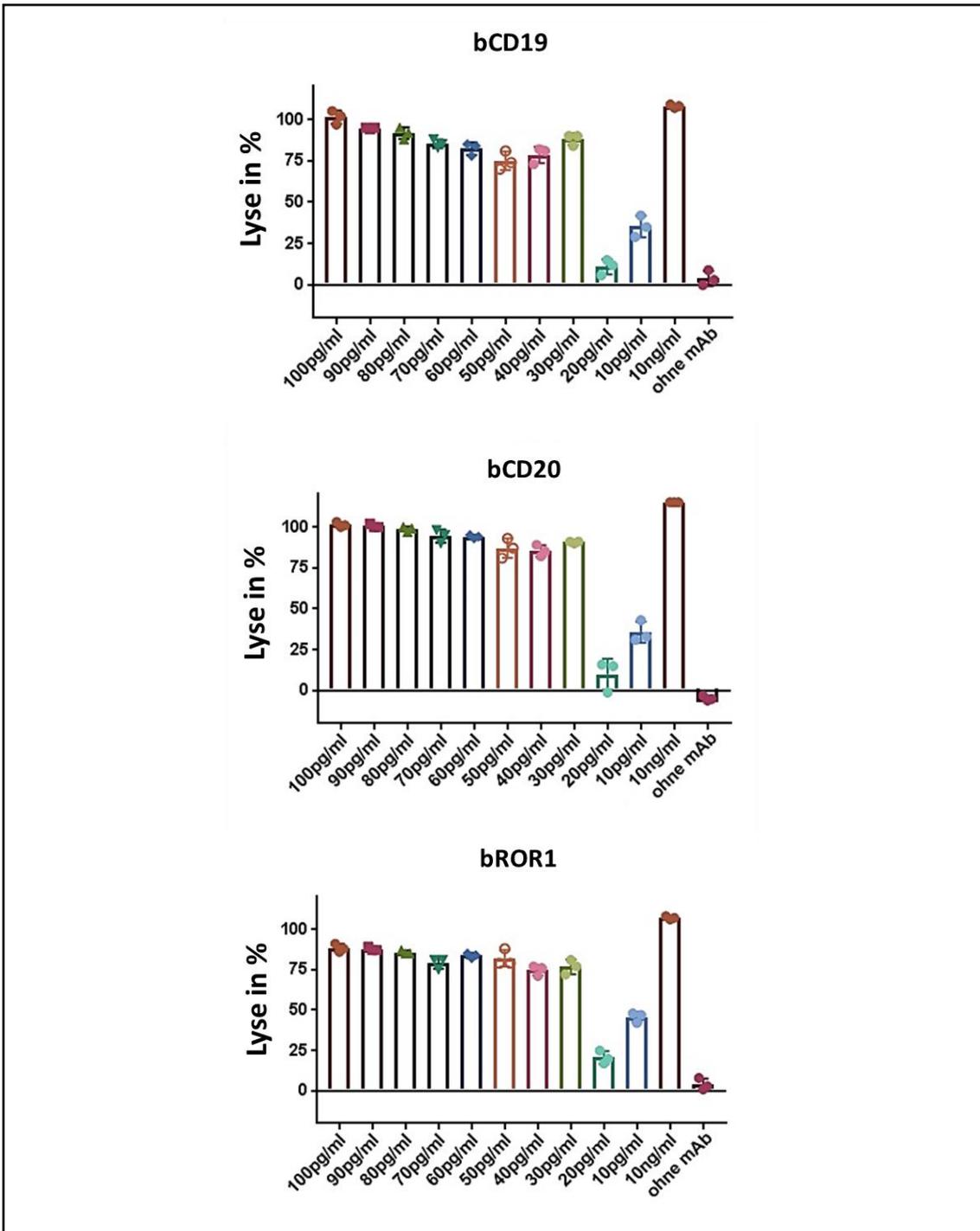


Abb. III-21 Antikörper-Titration Teil 2

Luciferase-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp. Es erfolgte eine Titration der biotinylierten Antikörper bCD19, bCD20 und bROR1 mit den Antikörper-Konzentrationen 100 pg/ml bis 10 pg/ml. Der Cut-Off der Lysewerte wurde mit 20 pg/ml ermittelt.

($n_{\Sigma} = 1$, E:T 2:1, Messung nach 48 Stunden)

Im letzten Versuch dieser Arbeit erfolgte nun eine erneute Titration der biotinylierten Antikörper bCD19, bCD20 und bROR1, außerdem eine Zweierkombination aus bCD19 und bCD20 und eine Dreierkombination aus bCD19, bCD20 und bROR1 mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp.

Die in Abbildung III-16 auf der x-Achse aufgetragenen Antikörper-Konzentrationen entsprechen der Konzentration der einzelnen Antikörper, d. h. beispielsweise bei 20 pg/ml der Zweierkombination aus bCD19 und bCD20 ergibt sich insgesamt eine Konzentration von 40 pg/ml.

Vor allem im Fenster 25 pg/ml bis 15 pg/ml ergab sich eine deutliche Abweichung der Lysewerte zwischen den einzelnen Antikörpern (Lyse < 40 %) und den Kombinationen (Lyse > 60 %). Das heißt, die Target-Zellen JeKo-1 Wildtyp wurden von den AdCAR-T-Zellen in Kombination mit einzelnen biotinylierten Antikörpern nicht mehr ausreichend lysiert, während mit Antikörper-Kombinationen, die zu einer höheren (zweifachen bzw. dreifachen) Gesamtkonzentration führten, immer noch eine ausreichende Lyse erreicht wurde (siehe *Abb. III-22*).

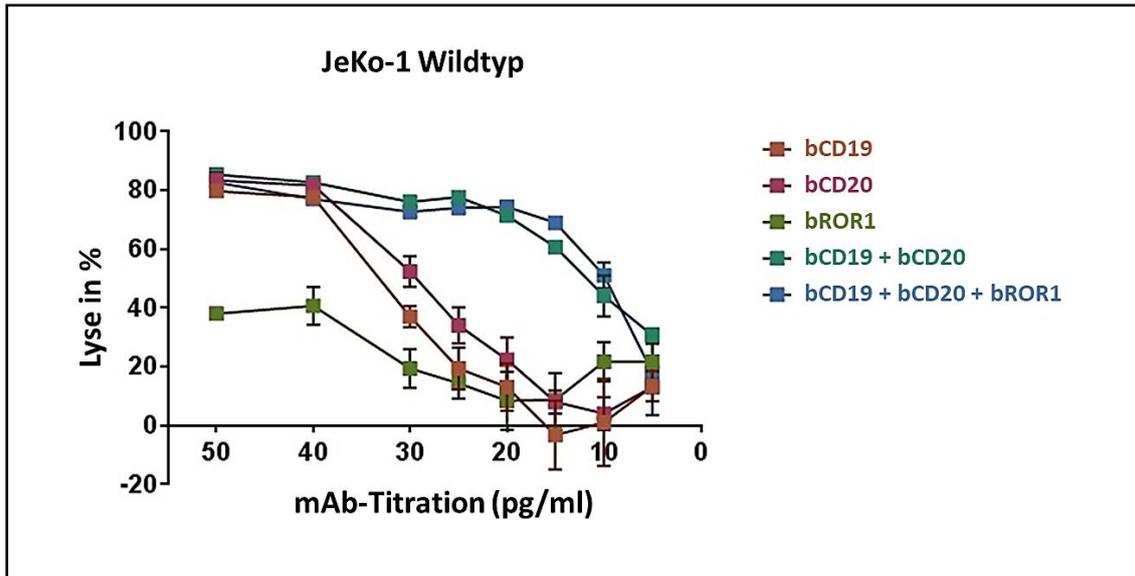


Abb. III-22 Antikörper-Titration mit Kombinationen

Luciferase-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Wildtyp. Es erfolgte eine Titration der biotinylierten Antikörper bCD19, bCD20 und bROR1 sowie einer Zweier- bzw. Dreierkombination dieser Antikörper. Die Einzelkonzentrationen betragen 50 pg/ml bis 5 pg/ml, d. h. beispielsweise bei der Zweierkombination aus bCD19 und bCD20 wurde mit jeweils 20 pg/ml eine Gesamtkonzentration von 40 pg/ml erreicht.

($n_{\Sigma} = 3$, E:T 2:1, Messung nach 48 Stunden)

IV. DISKUSSION

1. Die Relevanz einer neuen Therapie

Die Heilungsrate von über 90 % bei der pädiatrischen Form der B-ALL ist bemerkenswert; jedoch stellt die B-ALL immer noch die häufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen bei Kindern dar, und insbesondere für Erwachsene ist die Heilungsrate bedeutend schlechter. Diese Tatsachen zeigen, dass stets ein Bedarf an neuen Therapien besteht und dass diese Erkrankung noch nicht uneingeschränkt heilbar geworden ist. Die ALL ist hierbei nur ein Beispiel aus der Gruppe der malignen B-Zell-Erkrankungen, die es zu behandeln gilt. Leukämien und Lymphome machen laut des Jahresberichts des Deutschen Kinderkrebsregisters 2018 gemeinsam 44,6 % der neu gemeldeten Neoplasien bei Kindern aus, laut des Berichts „Krebs in Deutschland für 2013/2014“ bei Erwachsenen rund 7 % [7, 40, 41].

Es wurde in Kapitel I bereits auf die therapeutischen Maßnahmen eingegangen, die bei malignen B-Zell-Erkrankungen, insbesondere der pädiatrischen B-ALL, ergriffen werden können. Die gezielten Immuntherapien bieten einen Ansatz, der im Vergleich zur systemisch wirkenden Standard-Chemotherapie eine Behandlung ermöglicht, die durch das spezifische Abzielen auf bestimmte B-Zell-Antigene, z. B. CD20 (Rituximab), weniger toxisch wirkt und eine effiziente Lyse von Tumorzellen bewirkt. Dies gilt ebenso für die konventionellen CAR-T-Zellen, mit denen *in vitro* und *in vivo* große Erfolge in der Behandlung der ALL und Non-Hodgkin-Lymphome erzielt werden konnten, was 2017 in den USA zur Zulassung der CD19-CAR-T-Zell-Produkte Kymriah und Yescarta geführt hat. Gerade bei den Patienten, die nach Chemotherapie und Stammzelltransplantation therapierefraktär sind oder Rezidive aufweisen, können mit CD19-CAR-T-Zellen großartige Erfolge erreicht werden. 2014 und 2015 führten Davila und Lee et al. Phase-I-Studien mit von CD19-positiver B-ALL oder NHL betroffenen Patienten im Alter von 1 bis über 60 durch, die aufgrund ihrer zuvor fehlgeschlagenen Standardtherapie eine sehr schlechte

Prognose aufwiesen. Bei 70-90 % der Patienten wurde – altersunabhängig – eine komplette Remission erzielt [42, 43]. Die Altersunabhängigkeit stellt neben der höheren Effektivität einen Vorteil der CD19-CAR-Therapie gegenüber dem bispezifischen CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab dar, mit dem bei pädiatrischen Kohorten schlechtere Ergebnisse veröffentlicht wurden [44].

Neben den genannten Vorteilen treten bei der Anwendung der konventionellen CAR-T-Zell-Therapie auf ein breites Spektrum klinischer Indikationen die folgenden Probleme auf:

1. Die Expansion von konventionellen CAR-T-Zellen im Patienten ist unkontrollierbar und führt zu Risiken, wie beispielsweise Neurotoxizität oder dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (engl. cytokine release syndrome, CRS), das durch den massiven Zerfall von Tumorzellen entstehen und im schlimmsten Fall letal sein kann. Laut Brudno et al. treten nach CAR-T-Zell-Therapie in 80 % bzw. 40 % der Fälle kardiovaskuläre Symptomatik wie Fieber und Hypotension und bei bis zu 15 % der Patienten Hypoxie auf [45]. Prinzipiell ist das Auftreten eines CRS ein Zeichen für die Wirksamkeit der Therapie, jedoch steigt mit der Tumorlast auch die Gefahr eines höhergradigen, schwer therapierbaren CRS und erfordert größere Wachsamkeit seitens der Ärzte.

2. Wie alle gezielten Immuntherapien erzeugen CD19-CAR-T-Zellen einen starken Selektionsdruck auf das Tumorgewebe, was zu Antigenverlust führen kann. Sie werden wirkungslos, wenn die Tumorzellen das Target-Antigen verlieren [21]. Die Immunevasion (engl. ‚immune escape‘) von Tumoren ist die größte Problematik in der CAR-T-Zell-Therapie und bedroht den Erfolg dieser prinzipiell sehr effektiven und revolutionären Methode. Da maligne Tumoren häufig mit einer heterogenen Antigenexpression einhergehen, ist eine monovalente Therapie höchstwahrscheinlich nicht die optimale Lösung und muss durch innovativere, vorausschauende Therapieansätze ersetzt werden.

3. Die Lyse von Zellen durch die CAR-T-Behandlung hält über die nötige Therapiedauer hinweg an, weshalb weiterhin gesunde Gewebe geschädigt werden, die das Zielantigen der CAR-T-Zellen exprimieren (On-Target-Off-Tumor-Toxizität).

Insgesamt wird deutlich, dass die Therapie mit CAR-T-Zellen große Chancen bietet. Deren Effektivität im Vergleich zu anderen Methoden bei der Behandlung von malignen B-Zell-Erkrankungen ist unbestreitbar und öffnet die Türen zu einem Durchbruch in der onkologischen Therapie. Hoffnung besteht nicht nur für hämatoonkologische Erkrankungen, sondern auch für die Heilung von soliden Tumoren, da beispielsweise bei Glioblastomen durch EGFRvIII-CAR-T-Zellen bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden [46].

Neben den Chancen der CAR-T-Zell-Therapie dominieren aber momentan die Risiken die allgemeine Diskussion. Es besteht ein Bedarf an Strategien, wie die Lebensspanne oder Aktivität von CAR-T-Zellen limitiert bzw. kontrolliert werden kann. Nur so können negative Folgen wie letales CRS oder die Schädigung gesunder Gewebe abgewandt werden. Außerdem müssen Möglichkeiten zur Prävention eines Therapieversagens durch Antigenverlust erdacht werden. Unsere Arbeitsgruppe hat es sich zur Aufgabe gemacht, diese Problematiken anzugehen und die Therapie mit CAR-T-Zellen nicht nur sicherer, sondern auch flexibler zu machen.

Das Ziel der AdCAR-T-Zellen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, ist es, eine Therapie von malignen B-Zell-Erkrankungen zu erschaffen, die individuell auf den Patienten abgestimmt ist und nicht die Nachteile der konventionellen CAR-Therapie aufweist.

Sie soll durch An- und Ausschaltbarkeit Sicherheit bieten, Risiken minimieren und Toxizität kontrollierbar machen (*Steuerbarkeit*). Zudem soll sie es ermöglichen, mehrere Target-Antigene multipel synchron oder sequenziell anzugreifen (*Flexibilität*) und damit eine Chance zur Prävention möglicher Fallstricke, wie den Antigenverlust von Tumorzellen, bieten. Nicht zuletzt soll sie spezifisch auf die Tumorzellen abzielen, d. h. möglichst die gesunden Gewebe schonen (*Selektivität*) [32].

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf diese drei Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie (siehe *Abb. IV-1*) diskutiert.

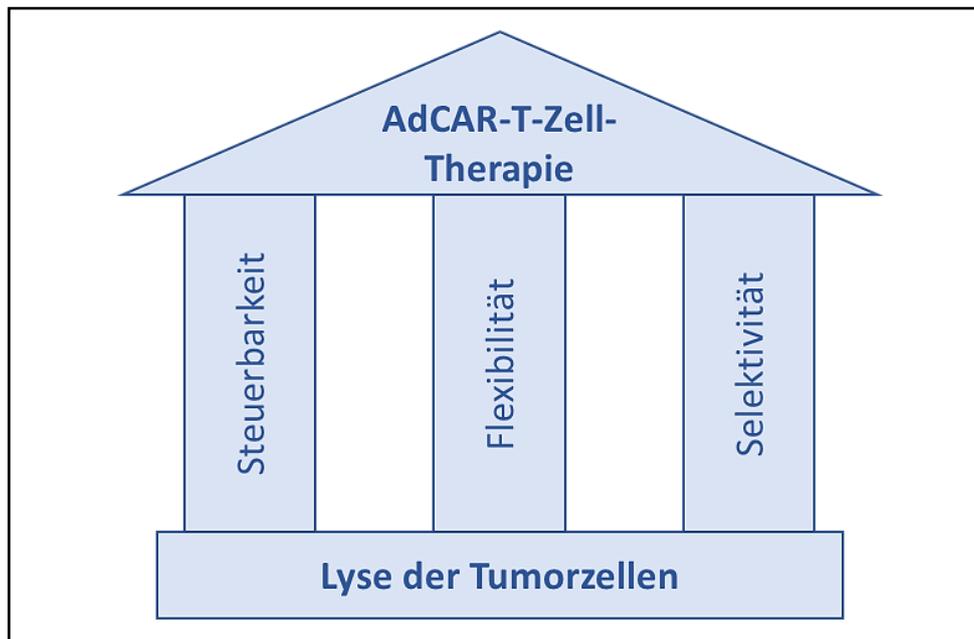


Abb. IV-1 Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie

Steuerbarkeit: Die AdCAR-T-Zell-Therapie soll kontrollierbar sein und die Möglichkeit eines ‚ON/OFF-switch‘ besitzen. Flexibilität: Mehrere Tumor-Antigene sollen parallel (multiples, synchrones Targeting) oder nacheinander (sequenzielles Targeting) angegriffen werden können. Selektivität: Gesundes Gewebe soll von der Therapie möglichst unangetastet bleiben und eine Lyse nur selektiv die Tumorzellen treffen.

2. Repräsentativität der Ergebnisse

2.1 Ausgewählte Zielstrukturen für spezifisches Killing

Die drei Oberflächenantigene CD19, CD20 und ROR1 wurden als Zielstrukturen (Target-Antigene) für die vorliegende experimentelle Arbeit mit AdCAR-T-Zellen ausgewählt, da sie ein linienspezifisches Killing von B-Zell-Erkrankungen ermöglichen. CD19 wird von normalen und neoplastischen B-Zellen sowie Follikulären Dendritischen Zellen exprimiert; CD20 ist auf fast allen normalen und neoplastischen B-Zellen und ROR1 auf undifferenziertem embryonalem Stammzellgewebe, B-CLL und Mantelzell-Lymphomen vorhanden. Die Antigene kommen also häufig in dieser Kombination als Oberflächenstrukturen auf neoplastischen B-Zellen vor (vgl. Kapitel I.1.4).

CD19 und CD20 haben sich als Zielstrukturen für gezielte Immuntherapien bereits klinisch bewährt, beispielsweise bei der Anwendung von CD19-CAR-T-Zellen, dem CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab oder dem monoklonalen Antikörper Rituximab (CD20). Auch bei ROR1, das als onkofetales Protein ohne Expression auf den meisten adulten Geweben einen optimalen Angriffspunkt für die Krebstherapie bietet, konnte Baskar et al. bereits 2012 mit dem spezifischen Antikörper BT-1 *in vitro* bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und Mantelzell-Lymphom Apoptose induzieren. Hudecek et al. zeigte 2013, dass mit ROR1-CAR-T-Zellen und CD19-CAR-T-Zellen *in vivo* bei Mäusen mit JeKo-1-Tumoren eine vergleichbare Lyse erzielt werden kann [3, 4, 11, 12, 47, 48].

Die drei Antigene stellen nicht nur aufgrund ihrer Linienspezifität eine gute Wahl als Target für die AdCAR-T-Zell-Therapie dar, sondern auch, da viele Tumorzellen eine Überexpression dieser Antigene aufweisen, wie auch die in der für diese Arbeit verwendete Zelllinie JeKo-1, ein Non-Hodgkin- bzw. Mantelzell-Lymphom. Beim FACS-Kontrollscreening (vgl. Kapitel III.1.1) bestätigte sich dies. CD19, CD20 und ROR1 sind in FACS-Analysen mit einfachen Methoden detektierbar und eignen sich somit zum Monitoring vorhandener Rest-Tumorzellen.

Die Möglichkeiten der AdCAR-T-Zell-Therapie sind mit CD19, CD20 und ROR1 längst nicht ausgeschöpft. Wie das erweiterte FACS-Screening (vgl. Kapitel III.1.2) zeigt, sind für das Mantelzell-Lymphom JeKo-1 beispielsweise auch die Antigene CD276, CD79b und CD22 eine Option. Vor allem letzteres hat in der gezielten Immuntherapie der B-ALL in Form des Immunkonjugats Inotuzumab ozogamicin oder CD22-CAR-T-Zellen bereits erfolgreich Anwendung erfahren. Es steht fest, dass sich für andere maligne B-Zell-Erkrankungen oder auch solide Tumoren bei Bedarf für die AdCAR-T-Zell-Therapie geeignete Antigene finden. Unsere Arbeitsgruppe hat dies bereits erfolgreich mit der Testung von zehn verschiedenen Antigenen an den AML-Zelllinien HL-60 und Kasumi-1 *in vitro* gezeigt [32].

2.2 Das Mantelzell-Lymphom JeKo-1

Das für diese Arbeit verwendete Mantelzell-Lymphom JeKo-1 dient als Beispiel für die große Gruppe der malignen B-Zell-Erkrankungen. Aufgrund der Flexibilität der AdCAR-T-Zell-Therapie (prinzipiell kann zu jedem beliebigen Antigen ein passender biotinylierter Antikörper hergestellt werden) lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Übertragung auf andere maligne B-Zell-Erkrankungen, d. h. B-Zell-Lymphome und B-Zell-Leukämien, zu. JeKo-1 ist nicht nur aus diesem Grund ein sinnvolles Beispiel für B-Zell-Erkrankungen, sondern auch, da die drei in dieser Arbeit untersuchten Antigene CD19, CD20 und ROR1 auf vielen B-Zell-Neoplasien zu finden sind.

Es wurde in Kapitel III.2 nachgewiesen, dass allen vier JeKo-1-Varianten eine adäquate Luciferase-Aktivität zugeschrieben werden kann, da sie im Vergleich zu den Negativkontrollen (< 200) nach 48 Stunden Counts von $> 10\,000$ (siehe *Abb. III-3*) zeigten. Außerdem korrelierten die Counts mit der Zellzahl: je mehr JeKo-1-Zellen im Well vorhanden waren, desto mehr Luciferin wurde umgesetzt und folglich höhere Counts erzielt (siehe *Abb. III-4*). Die Luciferin-Counts nahmen in beiden Versuchen über 48 Stunden hinweg zu, was vermutlich mit dem zunehmenden Umsatz des Luciferins in den Wells und der steigenden Zellzahl von JeKo-1

zusammenhing. Dieser parallele Anstieg der Zellzahlen über 48 Stunden hinweg sprach außerdem für eine ähnliche Wachstumskinetik aller vier JeKo-1-Varianten.

Für die anschließend im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte also angenommen werden, dass eine Lyse der Tumorzellen mit einem sinkenden bzw. niedrigen Count beim Luciferase-basierten Kill-Assay korrelieren würde.

3. Die drei Säulen der Tumortherapie mit AdCAR-T-Zellen

3.1 Steuerbarkeit der AdCAR-Funktion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD19, CD20 und ROR1 als Target-Antigene wirksam sind. Im Luciferase-basierten Kill-Assay lysierten AdCAR-T-Zellen (mit dem jeweiligen biotinylierten Antikörper) die CD19-positiven JeKo-1-Populationen zu $\geq 87,6\%$, die CD20-positiven JeKo-1-Populationen zu $\geq 99,4\%$ und die ROR1-positiven JeKo-1-Populationen zu $\geq 85,7\%$ (vgl. Kapitel III.3.1 bzw. V.5.1). Mit der äußerst geringen Antikörper-Konzentration von 10 ng/ml konnte eine hohe Lyse erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen somit die Qualität (Wirksamkeit) der gewählten Antigene nach, worin sich auch deren Quantität (Expressionsdichte) widerspiegelt.

Hier wird auch die Steuerbarkeit der AdCAR-T-Zellen deutlich. Sie bewirken nur dann eine Lyse der Tumorzellen, wenn der biotinylierte Antikörper zugegeben wird, der zu einem auf den Tumorzellen exprimierten Antigen passt. Die unspezifische Lyse ohne mAb betrug im Luciferase-basierten Kill-Assay durchschnittlich 27,0 %, die unspezifische Lyse mit dem Kontrollantikörper bControl betrug durchschnittlich 34,9 %. Bei CD19- bzw. CD20-negativen Zellen lag die unspezifische Lyse durch den jeweils ‚unpassenden‘ bmAb (bCD19 bzw. bCD20) bei durchschnittlich 35,1 % (siehe *Tab. III-4*). Die ON/OFF-Steuerbarkeit der Therapie durch die bmAb-Zugabe, den ‚Switch‘, ist also gegeben; AdCAR-T-Zellen wirken Antigen- und Antikörper-spezifisch (siehe *Abb. IV-2*).

Bei der Übertragung in die klinische Anwendung kann dies mehr Sicherheit bedeuten, da durch die schnelle Elimination von Antikörpern aus dem Kreislauf im Notfall, beispielsweise bei unkontrollierbaren Nebenwirkungen, die Therapie schnell unterbrochen werden kann. Ohne die Anwesenheit von bmAbs sind die AdCAR-T-Zellen im Prinzip nur normale T-Zellen.

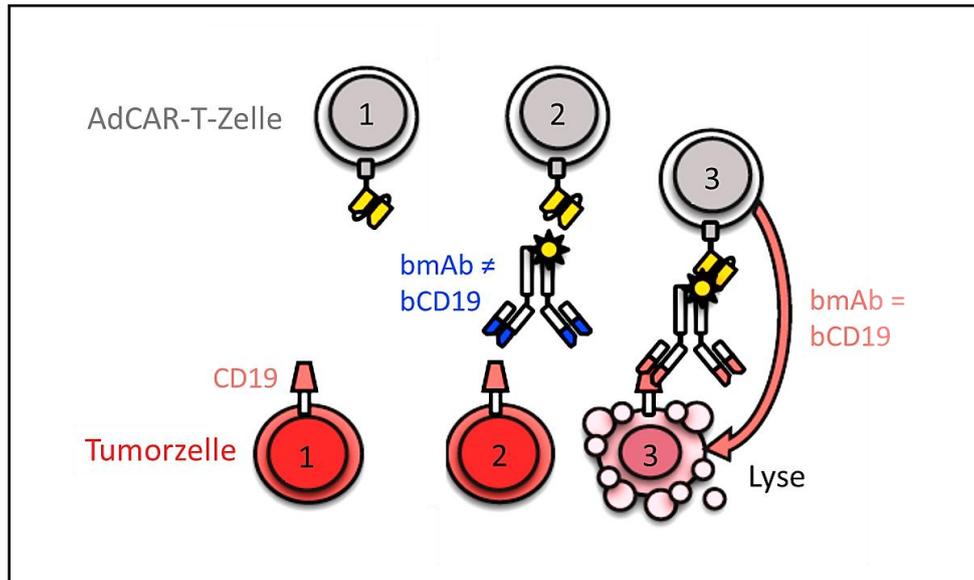


Abb. IV-2 Die Tumorzelllyse durch AdCAR-Zellen ist steuerbar

Eine AdCAR-T-Zelle allein führt bei CD19-positiven Tumorzellen nicht zur Lyse (1). Auch in Kombination mit einem anderen biotinylierten Antikörper (bmAb ≠ bCD19) kommt es nicht zur Lyse (2). Erst bei Zugabe des passenden Antikörpers bCD19 wird die Verbindung von AdCAR zur CD19-positiven Tumorzelle hergestellt, wodurch die AdCAR-T-Zelle aktiviert wird und die Tumorzelle lysiert (3).

[Adaptiert aus Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. 2014 – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting]

Zudem ist die Lysewirkung von AdCAR-T-Zellen verschiedener Spender vergleichbar (zwischen den drei Spendern betrug die durchschnittliche Standardabweichung der Lyse mit spezifischem bmAb 4,6 %) und lässt somit die universelle Anwendung der Methode zu. Ferner ist die maximale Lyse von annähernd 100 % mit verschiedenen Antikörpern bei verschiedenen Spendern nach circa 48 Stunden erreicht, was eine Beobachtung der Lyseaktivität im Zeitverlauf und daher – zumindest *in vitro* – eine gewisse Vorhersage des Verhaltens der AdCAR-T-Zellen und damit des Therapieerfolgs zu einem früheren Zeitpunkt möglich macht. Zusammenfassend zeigen die ersten Lyseversuche dieser Arbeit (vgl. Kapitel III.3), dass mit AdCAR-T-Zellen eine spezifische, steuerbare, spendervergleichbare und beobachtbare Therapie realisierbar ist.

3.2 Flexibilität bei Therapieversagen durch Antigenverlust

Der Vergleich der AdCAR-T-Zellen mit konventionellen CAR-T-Zellen ist nicht Hauptbestandteil dieser Arbeit, soll jedoch nicht unerwähnt bleiben.

Wie zuvor besprochen wurde, ist ein Vorteil der AdCAR-T-Zell-Therapie die Möglichkeit einer zeitlichen und qualitativen Kontrolle der lysierenden T-Zell-Funktion. Sie sind ausschließlich gegen Biotin im Rahmen einer spezifischen Linkerstruktur, dem Linker-Label-Epitop (LLE), gerichtet, sodass keine Interferenz mit physiologischem Biotin geschieht. Die Therapie mit konventionellen CAR-T-Zellen zeichnet sich durch ihre Effektivität aus; unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass AdCAR-T-Zellen trotz der ‚Zwischenschaltung‘ eines biotinylierten Antikörpers eine ebenso potente Effektorfunktion wie herkömmliche CAR-T-Zellen besitzen [32]. Dies konnte mit dem Nebenversuch in dieser Arbeit reproduziert werden, bei dem eine vergleichbar gute Lyse von JeKo-1 durch konventionelle CD19-CAR-T-Zellen und AdCAR-T-Zellen mit bCD19 erreicht wurde (vgl. Kapitel III.4).

Wie bereits erwähnt, kommt es bei den gezielten Immuntherapien häufig zum Phänomen der Immunevasion, d. h. die Tumorzellen entgehen durch bestimmte Mechanismen (meist Antigenverlust) der Therapiewirkung bzw. dem Immunsystem. Auch mit konventionellen CD19-CAR-T-Zellen ist das Therapieansprechen im Follow-Up häufig nicht von längerer Dauer, da es zur Entstehung einer CD19-negativen Tumorvariante kommt. Beispielsweise berichtete 2016 Maude et al. nach einer Studie, die am Children's Hospital of Philadelphia und der University of Pennsylvania durchgeführt wurde, dass von 59 behandelten pädiatrischen Patienten mit rezidivierender oder therapierefraktärer B-ALL 93 % eine komplette Remission erreichten, davon 88 % MRD-negativ. Nach durchschnittlich einem Jahr erfolgte das Follow-Up; 20 Patienten (34 %) hatten einen Rückfall erlitten, hiervon 13 (22 %) mit CD19-negativer Tumorlast [49]. In einer Metaanalyse von 2018 fassten Majzner und Mackall die Ergebnisse von 6 solcher Studien zusammen, davon 4 mit pädiatrischen und 2 mit erwachsenen Patienten. Die Ergebnisse dürfen nur unter Vorbehalt interpretiert werden, da sich

die Studien in der Dauer der Follow-Ups unterscheiden. Die Rückfallquoten variierten von 29-57 %, wobei der Anteil der CD19-negativen Rückfälle an der Gesamtzahl der behandelten Patienten bei den pädiatrischen Studien zwischen 18 und 25% und bei den Studien mit erwachsenen Patienten 7 bzw. 9 % betrug. Im Vergleich dazu lagen bei Studien mit dem bispezifischen CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab die CD19-negativen Rückfallquoten in einem ähnlichen Bereich, bei 12 bis 21 %. Auch bei Studien mit von NHL, Multiplem Myelom und Glioblastom betroffenen Patienten wurde das Phänomen des Antigenverlusts berichtet [50].

Die Mechanismen der Antigenverlusts wurden bis heute noch nicht vollständig verstanden, der Verlust von CD19 bei B-ALL wurde aber bislang am besten untersucht. Am häufigsten scheinen hier drei verschiedene Arten der Immunevasion von Tumoren aufzutreten (siehe *Abb. IV-3*). Tumorzellen verändern aufgrund des Selektionsdrucks durch die CAR-T-Zellen die Expression des Target-Antigens, entweder durch den kompletten Verlust dieses Antigens (Antigen-negative Tumorvarianten), eine Veränderung hin zu einer anderen Zellreihe („lineage switch“) oder durch eine Herunterregulierung der Antigenexpression auf ein unterschwelliges Niveau, das nicht für eine CAR-Aktivierung ausreicht (Antigen-schwache Tumorvarianten) [26, 50].

Antigen-negative Tumorzellen können durch Splice-Varianten der Antigen-mRNA entstehen. Das bedeutet für die Patienten ein Rezidiv mit einer phänotypisch ähnlichen Tumorerkrankung, aber ohne die Expression der Oberflächenstruktur, die den CAR-T-Zellen als Target-Antigen dient. Fischer et al. analysierte 2017 die Expression von CD19-Isoformen bei B-ALL in pädiatrischen und adulten Patienten. Die Arbeitsgruppe fand einige CD19-Splice-Varianten, denen entweder das extrazelluläre Epitop, die Transmembrandomäne oder ein zytosolischer Anteil von CD19 fehlt, was in jedem dieser Fälle zu einer Verstümmelung des Antigens oder einem kompletten Verlust von CD19 führt, und damit die Bindung der CD19-CAR-T-Zellen an das Epitop sowie die Erkennung des Antigens in der Durchflusszytometrie verhindert. Wie genau es zur Entstehung der Splice-Varianten kommt, ist nicht ganz klar, doch manche der entdeckten Splice-Varianten scheinen bereits zum Zeitpunkt der B-ALL-Diagnosestellung vorhanden zu sein und durch den Therapiedruck der

CD19-CAR-T-Zellen selektiert bzw. so stark angereichert zu werden, sodass sie zum dominanten Klon der Erkrankung werden [51, 52].

Eine zweite Art der Entstehung Antigen-negativer Tumorvarianten wurde u. a. 2016 von Gardner et al. beschrieben. Statt des reinen Verlusts von CD19 kann es nach der CAR-Therapie der B-ALL zur Ausprägung einer phänotypisch unterschiedlichen Erkrankung kommen, die ebenfalls kein CD19 exprimiert und zusätzlich andere Antigene aufweist, meist die einer AML. Es erfolgt also eine Umschaltung der Zellreihe von lymphatisch auf myeloisch. Einerseits könnte dies dadurch geschehen, dass der Therapiedruck der CD19-CAR-T-Zellen kleine myeloische Subklone selektiert. Laut Jacoby et al., die dies am Mausmodell untersuchten, wird der volle AML-Phänotyp aber selten von einem Subklon bereits vor der CAR-Therapie exprimiert, sondern entsteht wahrscheinlich erst durch die genetische Neuprogrammierung einer Tumorzelle während der Therapie, wobei die genauen Vorgänge bislang unbekannt sind [53, 54].

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt wurde, spielen auch andere Antigene als CD19 bei den gezielten Immuntherapien eine Rolle, so auch CD22. CD22-CAR-T-Zellen führten in klinischen Studien zu vergleichbaren Ergebnissen wie CD19-CAR-T-Zellen, sowohl was den Tumorlyse-Effekt, als auch die Zahl der unerwünschten Rezidive aufgrund von Antigenverlust angeht. Interessanterweise kommt es bei der Therapie mit CD22-CAR-T-Zellen meist zu Rezidiven aufgrund einer verminderten Oberflächenexpression des Target-Antigens, im Gegensatz zur CD19-CAR-T-Zell-Therapie, bei der hauptsächlich ein kompletter Verlust des Antigens vorliegt. So berichtete im Jahre 2018 Fry et al. von einer klinischen Studie, bei der von 21 behandelten Patienten 7 einen Rückfall aufgrund einer Herunterregulierung der CD22-Dichte erlitten. Bei den untersuchten Tumorzellen wurden – wieder im Gegensatz zur CD19-CAR-T-Zell-Therapie – auf genetischer Ebene keine Veränderungen festgestellt. Daher wurde die quantitative Erniedrigung der Oberflächenexpression eher auf eine Änderung der posttranskriptionalen Vorgänge zurückgeführt [28].

Die Notwendigkeit einer hohen Antigen-dichte für die Aktivierung der CAR-T-Zellen wurde bereits 2015 von Watanabe et al. beschrieben, stellt eine Limitierung der

CAR-T-Zell-Therapie dar und hat Konsequenzen für die individuelle Therapieplanung [55].

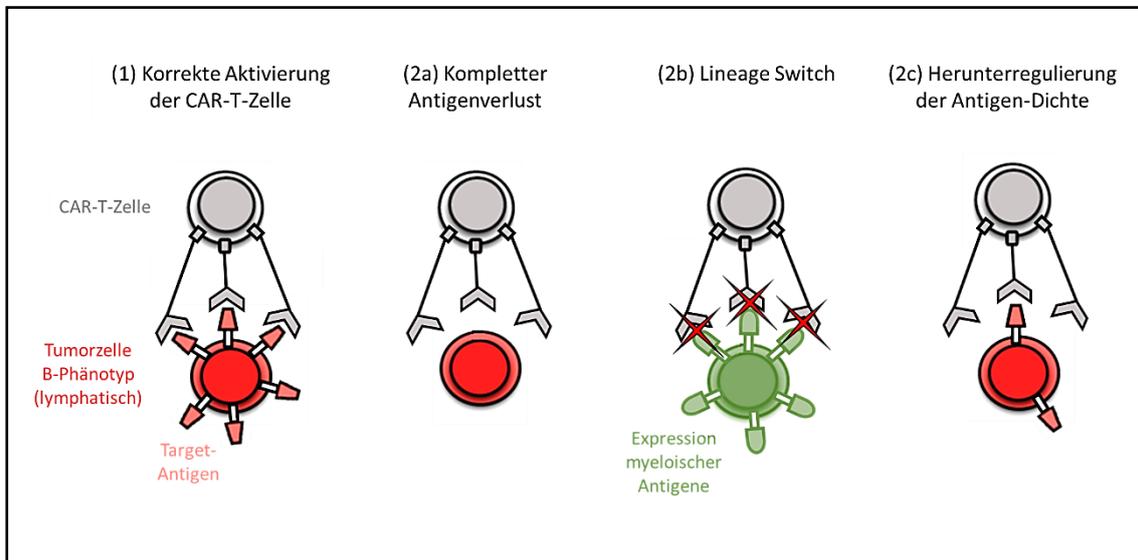


Abb. IV-3 Arten der Immunevasion von Tumoren

Eine CAR-T-Zelle wird durch Bindung an das Target-Antigen aktiviert und lysiert die Antigen-tragende Tumorzelle (1). Rezidive nach einer CAR-T-Zell-Therapie entstehen meist durch eine gewisse Form des Antigenverlusts: Hierbei kann zum kompletten Antigenverlust kommen (2a), d. h. Antigen-negative Tumorzellen werden durch die monovalente Immuntherapie selektiert. Es ist aber auch ein ‚lineage switch‘ möglich, d. h. die ursprünglich lymphatische Erkrankung rezidiert mit einem myeloischen Phänotyp (2b). Besonders bei CD22-CAR-T-Zell-Therapie kommt es zu einer Herunterregulierung der Antigen-dichte (2c) unter ein Niveau, das für die Aktivierung der CAR-T-Zellen notwendig wäre. Bei keiner der in 2a-c genannten Formen des Antigenverlusts kommt es zur Aktivierung der CAR-T-Zelle.

Aus den bisherigen Ergebnissen klinischer Studien mit monovalenten CAR-T-Zellen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die alleinige Suche nach alternativen Antigenen für eine monovalente CAR-Therapie nicht ausreicht und dass das Targeting einzelner Antigene durch den singulären immuntherapeutischen Selektionsdruck immer letzten Endes zu einem Antigenverlust führen kann.

Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Nutzung des ‚epitope spreading‘, eines immunologischen Phänomens, das vor circa 20 Jahren am Mausmodell gezeigt werden konnte. Der Begriff beschreibt den Übergang der Immunantwort (in diesem Fall der CAR-T-Zell-Aktivität) von einem Antigen auf ein anderes. Die Kombination von CAR-T-Zellen mit immunmodulierenden Substanzen wie beispielsweise Impfungen oder Checkpoint-Inhibitoren könnte bei dieser Art der Therapie ‚epitope spreading‘ induzieren, was aber bislang unzureichend erforscht ist [56].

Die allogene Stammzelltransplantation ist und bleibt eine Therapiealternative, die nicht spezifisch gegen ein Antigen gerichtet ist. Nach der kompletten Ablation der Hämatopoese des Patienten mit Chemotherapie und Bestrahlung ist das Ziel, mit der Gabe von hämatopoetischen Stammzellen eines gesunden Spenders einen Graft-vs.-Host-Effekt zu induzieren, d. h. die leukämischen Zellen durch die Immunantwort der Spenderzellen zu bekämpfen. Allerdings ist zu bedenken, dass viele Patienten bereits vor der CAR-T-Zell-Therapie eine erfolglose Stammzelltransplantation erhalten haben und dass die Methoden zur Ablation der patienteneigenen Stammzellen mit ihrer hohen Toxizität zu schweren Nebenwirkungen und Folgeschäden führen können [26].

Als sinnvollster Lösungsansatz erscheint das sequenzielle oder simultane Targeting von mehreren Antigenen. Hierfür werden momentan mehrere Variationen von CAR-T-Zellen klinisch getestet, die nach verschiedenen Prinzipien funktionieren. Beispielsweise können mittels eines Tandem-CAR gleichzeitig mehrere Target-Antigene mit nur einem Molekül gebunden werden [57]; es können zwei oder drei unterschiedliche CAR-Moleküle von einer einzigen T-Zelle exprimiert werden, die entsprechend viele Antigene binden [58]; oder es werden verschiedene monovalente CAR-T-Zellen gleichzeitig oder sequentiell verabreicht [50]. Generell wird aus der klinischen Erfahrung deutlich, dass kombinatorische Therapien in der Onkologie die bislang wirksamsten Ansätze darstellen. Diese können somit auch gegen Tumorrezidive durch Antigenverlust in der Immuntherapie die beste präventive Maßnahme sein. Da sich Tumorzellen selbst an schwierigste Umgebungen adaptieren können und längst nicht alle Escape-Mechanismen erforscht sind, bleibt aber die Befürchtung, dass selbst das Targeting mehrerer

Antigene nicht ausreichen könnte und lässt die Schlussfolgerung zu, dass Therapien mit größtmöglicher Flexibilität benötigt werden [26].

Unsere Therapie mit AdCAR-T-Zellen ermöglicht genau dies: ein multiples, sequenzielles oder synchrones Targeting von praktisch beliebig vielen Antigenen. Da die AdCAR-T-Zellen nach erfolgreichem Anwachsen im Patienten konsistent bleiben und nur die Antikörpergabe verändert werden muss, ist die individuelle Therapieanpassung an veränderte Tumorbedingungen nicht nur einfach und flexibel, sondern auch kostengünstiger als beispielsweise die Produktion neuer CAR-T-Zellen mit anderer Antigenespezifität.

Auch andere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit ähnlichen Ansätzen beschäftigt und Adaptersysteme entwickelt, wie bereits in Kapitel I.4 erwähnt wurde. Beispielsweise publizierte 2016 Ma et al. zu sCAR-T-Zellen, die mittels eines anti-FITC-,switch'-Moleküls universell an verschiedene Tumorantigene binden können. Im Folgejahr veröffentlichte Lohmueller et al. Forschungsergebnisse zu ‚anti-tag‘ CAR-T-Zellen (AT-CAR-T-Zellen), die mit ihrer Biotin-bindenden Streptavidin-Domäne biotinylierte Antikörper auf Tumorzellen erkennen.

Schwierig ist hierbei, dass Streptavidin – im Gegensatz zum LLE unserer AdCAR-T-Zell-Technologie - als ursprünglich bakterielles Protein sehr immunogen ist und daher Streptavidin-tragende CAR-T-Zellen ein hohes Abstoßungspotenzial besitzen. Dasselbe Problem ergibt sich für FITC (Anti-Fluorescein Isothiocyanat), da dieser künstliche Fluoreszenzfarbstoff grundsätzlich körperfremd ist. Auch besteht bei Streptavidin die Gefahr einer Absättigung durch endogenes Biotin, da Streptavidin eine hohe Affinität zu natürlich vorkommendem Biotin aufweist [30, 59].

In dieser Arbeit wurde eine Mischung aus Wildtyp- und Knockout-Varianten des Mantelzell-Lymphoms JeKo-1 verwendet, um die realistische Situation einer heterogenen malignen Erkrankung mit Antigen-negativen Subklonen zu simulieren und zu testen, ob sequenzielles oder multiples synchrones Targeting die Selektion von Antigen-negativen Tumorvarianten verhindern kann. Wie die klinische Erfahrung bisher gezeigt hat, so eliminierte auch in unseren Versuchen *in vitro* singuläres Targeting Antigen-positive Zellen, während Antigen-negative verschont blieben. Darüber hinaus führte duales Targeting mit CD19 und CD20 zur Auswahl

von doppelt negativen JeKo-1-Zellen. Erst die Addition eines dritten Antikörpers führte letztendlich zur bestmöglichen Elimination von Tumorzellen, was den Vorteil und die erhöhte Erfolgswahrscheinlichkeit einer Therapie aufzeigt, die von Beginn an multivalent gestaltet wird. Auch sequenzielles Targeting, d. h. die zeitlich versetzte Zugabe von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität, ist möglich und führte in unseren Versuchen letztendlich zu einer befriedigenden Lyse (vgl. Kapitel III.5). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Effektivität, zeitliche Flexibilität und patientenindividuelle Anpassbarkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie.

3.3 *Selektivität* mittels Surface Activation Matrix

Abgesehen von der B-Zelllinie sollen keine anderen vitalen Gewebe von der Therapie beeinträchtigt werden, da sie die Target-Antigene gar nicht oder nur minimal exprimieren. Das durch die AdCAR-T-Zellen geschehende Killing funktionaler B-Zellen (die ebenfalls CD19 und CD20 exprimieren) wird vorerst im Hinblick auf eine klinische Anwendung akzeptiert, da es möglich ist, die B-Zell-Funktion mittels Immunglobulingabe zu ersetzen. Zudem werden CD19, CD20 und ROR1 von den Stammzellen im Knochenmark nicht exprimiert, weshalb sich die B-Zelllinie möglicherweise nach abgeschlossener Therapie regenerieren kann. Hier zeigt sich auch ein Vorteil der AdCAR-T-Zellen gegenüber der konventionellen CAR-T-Zellen: Während die konventionellen CD19-CAR-T-Zellen nach erfolgreichem Engraftment (Anwachsen) im Patienten kontinuierlich ihre Wirkung entfalten und auch nach erfolgreicher Therapie weiterhin benigne CD19-positive Zellen lysieren, agieren AdCAR-T-Zellen ohne zusätzliche Gabe des biotinylierten Antikörpers, der als ‚Switch‘ fungiert, als normale T-Zellen und lassen gesundes Gewebe unbeeinträchtigt. Somit wird der gesunden B-Zell-Population die Gelegenheit gegeben, sich erfolgreich zu regenerieren. Dass dies prinzipiell möglich ist, hat Roll et. al 2006 gezeigt. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis und vollständiger B-Zell-Depletion nach Rituximab-Therapie wurden 2 Jahre lang die B-Zell-Level beobachtet. Die meisten Patienten erreichten 1 Jahr nach der Therapie bereits wieder normale Level an CD20-positiven B-Zellen [60].

Allerdings bleibt bei der Depletion von B-Zellen folgendes zu beachten: auch, wenn deren Funktion durch Immunglobulingabe ersetzt werden kann, so stellt dies doch nach erfolgreicher Therapie der malignen Erkrankung unnötige Risiken dar. IgG-Ersatztherapie führt bei bis zu 50 % der Patienten zu lokalen oder systemischen Nebenwirkungen, wie z. B. Kopf- und Muskelschmerzen, Schüttelfrost und Fieber. Seltener treten ernstere Komplikationen wie Nierenversagen, aseptische Meningitis, Thromboembolien oder Enteritis auf [61].

On-Target-Off-Tumor-Toxizität durch die Verwendung anderer Target-Antigene als CD19 ist ebenfalls möglich und könnte noch schwerwiegender sein. Selbst wenn entartete Zellen viele Antigene im Vergleich zu normalen Körperzellen überexprimieren (wie auch CD20 oder ROR1), könnte der Unterschied in der Antigendichte nicht ausreichend sein, um die gesunden Zellen vor der Lysewirkung der AdCAR-T-Zellen zu schützen.

Durch die Verwendung einer Surface Activation Matrix (SAM) können nicht nur solche Nebenwirkungen verhindert werden, es eröffnen sich auch neue Möglichkeiten, Antigene als Zielstrukturen für die AdCAR-T-Zell-Therapie zu nutzen, die von gesunden Körpergeweben exprimiert werden. Wie durch die Versuche in Kapitel III.6 gezeigt wurde, erstellen unterschwellig titrierte biotinylierte Antikörper gebunden an mehrere Antigene auf derselben Zielzelle eine Oberfläche, die die Schwelle der notwendigen Antigendichte für die CAR-Aktivierung überschreitet. Dies führt dazu, dass AdCAR-T-Zellen Zielzellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen, die nur eines der Zielantigene tragen, differenzieren und lysieren können (siehe *Abb. IV-4*). Diese Selektivität ist wesentliche Voraussetzung für die Wirksamkeit von körpereigenen Antigenen als Ziel-Antigene für die AdCAR-Therapie.

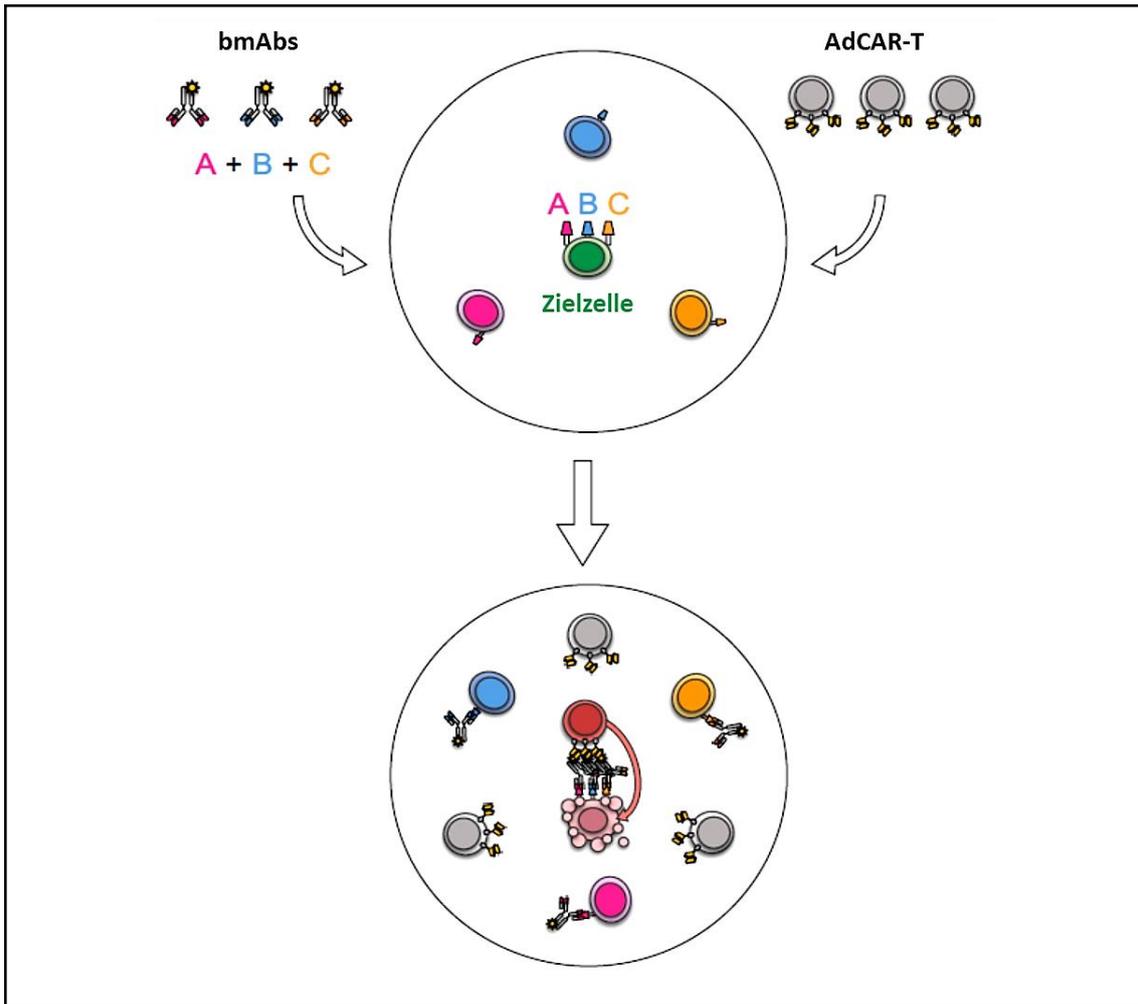


Abb. IV-4 Schonung gesunder Gewebe durch spezifische Lyse von Tumorzellen mittels Surface Activation Matrix

Nur die maligne Zielzelle exprimiert die Gesamtheit der Target-Antigene. Aus diesem Grund werden die AdCAR-T-Zellen spezifisch zur Lyse dieser Zielzelle angeregt, da genügend Oberflächenantigene mit Antikörpern (bmAbs) abgesättigt sind. Auf gesunden Zellen (blau, orange und rosa dargestellt), die einzelne Target-Antigene tragen, bleibt die Antikörperkonzentration unerschwellig, was zu keiner Aktivierung des AdCARs führt.

[Adaptiert aus *Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*]

4. Ausblick

Abschließend gilt hervorzuheben, dass die AdCAR-Technologie durch ihre hohe Wirksamkeit, die Möglichkeit zum sequenziellen und multiplen synchronen Targeting zur Vermeidung von Immunevasion, die klinische Sicherheit, die präzise Steuerung der CAR-Funktion und das differenzielle Targeting ein großes klinisches Potenzial aufweist. Als Folge ihrer einzigartigen Eigenschaften stellt die AdCAR-T-Zell-Therapie eine individualisierte Immuntherapie und damit eine realistische Alternative zu Chemotherapie und Bestrahlung dar.

Die Erweiterung der klinischen Anwendung auf heterogene Erkrankungen wie AML und solide Tumoren wird dadurch möglich, dass mit der Surface Activation Matrix auch Oberflächenstrukturen als Target-Antigene in Betracht gezogen werden können, die auf körpereigenem, gesundem Gewebe exprimiert werden. Es wird eine Translation in die Klinik angestrebt. Derzeit sind klinische Studien zum Nachweis von Sicherheit und Wirksamkeit in Vorbereitung. Außerdem wird es wichtig sein, Schwellenkonzentrationen weiterer Antigene *in vitro* im Zusammenhang mit Antigendichte und -plastizität zu untersuchen, sowie *in vivo* die pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkung der AdCAR-T-Zellen und biotinylierten Antikörper zu evaluieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie gegenüber malignen B-Zell-Erkrankungen demonstriert und deren Vorteile gegenüber der konventionellen CAR-Therapie evaluiert. Diese Ergebnisse bestätigen die *Steuerbarkeit*, *Flexibilität* und *Selektivität* und somit die drei Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie.

Zunächst wurde sichergestellt, dass die verwendete Tumor-Zellkultur JeKo-1 (Mantellzell-Lymphom) adäquate Eigenschaften besitzt, um die geplanten Luciferase- und FACS-basierten Kill-Assays durchzuführen und beispielhaft auf B-phänotypische Malignome anwenden zu können. Die JeKo-1-Kultur exprimierten die Oberflächenantigene CD19, CD20 und ROR1, die entsprechende Knockout-Variante nicht. Bei JeKo-1 lag eine ausreichende Luciferase-Aktivität vor.

1. Steuerbarkeit: Es wurde gezeigt, dass sich die Oberflächenantigene CD19, CD20 und ROR1 als Zielstrukturen für die AdCAR-T-Zellen eignen. Maligne B-Zellen können so spezifisch Antigen- und Antikörper-abhängig lysiert werden, wobei die Lysewirkung der AdCAR-T-Zellen durch die Zugabe des passenden biotinylierten Antikörpers an- und ausschaltbar ist. Hiermit bieten die AdCAR-T-Zellen eine erhöhte Sicherheit gegenüber konventionellen CAR-T-Zellen, deren Funktion sich nach der Gabe nicht mehr kontrollieren lässt. Über einen Zeitraum von 48 Stunden war eine Zunahme der Lyse beobachtbar und mit den AdCAR-T-Zellen dreier verschiedener Spender wurden vergleichbare Lysewerte erzielt. Bei der Behandlung eines B-phänotypischen Malignoms (mit typischen B-phänotypischen Oberflächenmerkmalen) können also gute Ergebnisse erzielt werden, die mit AdCAR-T-Zellen unterschiedlicher Spender reproduzierbar sind.

In einem Nebenversuch wurden AdCAR-T-Zellen und konventionelle CD19- und GD2-CAR-T-Zellen miteinander verglichen, wobei mit allen Effektorzellen adäquate Lysen erreicht wurden. AdCAR-T-Zellen stellen damit in dieser Hinsicht eine gleichwertige Alternative zu konventionellen CAR-T-Zellen dar.

2. Flexibilität: Um die AdCAR-T-Zellen nicht nur als Alternative, sondern auch als Weiterentwicklung der konventionellen CAR-T-Zellen einzuführen, wurde außerdem mittels der Knockout-Varianten von JeKo-1 gezeigt, dass es möglich ist, das Problem des Antigenverlusts von Tumorzellen (Immune-Escape-Mechanismus) zu umgehen. Trotz veränderter Zielstrukturen bzw. Wegfall eines Target-Antigens wird durch multiples, synchrones Targeting (mittels Kombination von Adaptermolekülen) von CD19, CD20 und alternativen Antigenen wie ROR1 eine erfolgreiche Behandlung ermöglicht. Auch eine Eskalation der Monotherapie mit sequenzieller Addition von Adaptermolekülen ist realisierbar. Eine der größten Hürden in der Behandlung von hämatoonkologischen Erkrankungen kann so überwunden werden.

3. Selektivität: Zudem wurde nachgewiesen, dass die Sicherheit der Therapie durch kombiniertes Targeting in unterschwelliger Konzentration gewährleistet ist. Bleibt die Konzentration der Adaptermoleküle unter einem bestimmten Niveau, so bleibt der Effekt auf die Target-Zelle aus; erst durch deren multiple Expression von Zielantigenen kommt es zur Aktivierung der AdCAR-T-Zellen und damit zur Lyse der Tumorzelle. Die Toxizität auf gesundes Gewebe (On-Target-Off-Tumor-Toxizität) kann somit minimiert und die Aktivität der AdCAR-T-Zellen auf die Tumorzellen konzentriert werden.

VI. VERZEICHNISSE

1. Literaturverzeichnis

1. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. (2014) *Janeway Immunologie*, 7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg
2. Ramsland, P.; Farrugia, W. (2002) Crystal structures of human antibodies: A detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. *J Mol Recognit* 15(5): 248–259. doi: 10.1002/jmr.585
3. Wang, K.; Wei, G.; Liu, D. (2012) CD19: A biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 1(1): 36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36
4. Cragg, M.; Walshe, C.; Ivanov, A.; Glennie, M. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8: 140–174. doi: 10.1159/000082102
5. Borcherdig, N.; Kusner, D.; Liu, G.-H.; Zhang, W. (2014) ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology. *Protein Cell* 5(7): 496–502. doi: 10.1007/s13238-014-0059-7
6. Chiaretti, S.; Vitale, A.; Cazzaniga, G.; Orlando, S.; Silvestri, D.; Fazi, P.; Valsecchi, M.; Elia, L.; Testi, A.; Mancini, F.; Conter, V.; te Kronnie, G.; Ferrara, F.; Di Raimondo, F.; Tedeschi, A.; Fioritoni, G.; Fabbiano, F.; Meloni, G.; Specchia, G.; Pizzolo, G.; Mandelli, F.; Guarini, A.; Basso, G.; Biondi, A.; Foà, R. (2013) Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *Haematologica* 98(11): 1702–1710. doi: 10.3324/haematol.2012.080432
7. Katz, A.; Chia, V.; Schoonen, W.; Kelsh, M. (2015) Acute lymphoblastic leukemia: An assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes Control* 26(11): 1627–1642. doi: 10.1007/s10552-015-0657-6
8. Dworzak, M.; Buldini, B.; Gaipa, G.; Ratei, R.; Hrusak, O.; Luria, D.; Rosenthal, E.; Bourquin, J.-P.; Sartor, M.; Schumich, A.; Karawajew, L.; Mejstrikova, E.; Maglia,

- O.; Mann, G.; Ludwig, W.-D.; Biondi, A.; Schrappe, M.; Basso, G. (2018) AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 94(1): 82–93. doi: 10.1002/cyto.b.21518
9. Bartram, C.; Schrauder, A.; Köhler, R.; Schrappe, M. (2012) Acute lymphoblastic leukemia in children: Treatment planning via minimal residual disease assessment. *Dtsch Arztebl Int* 109(40): 652–658. doi: 10.3238/arztebl.2012.0652
 10. Cooper, S.; Brown, P. (2015) Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 62(1): 61–73. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.006.
 11. Goto, H. (2015) Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress. *Pediatr Int* 57(6): 1059–1066. doi: 10.1111/ped.12837
 12. Jabbour, E.; Kantarjian, H. (2016) Immunotherapy in adult acute lymphoblastic leukemia: The role of monoclonal antibodies. *Blood Adv* 1(3): 260–264. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000042
 13. Masopust, D.; Vezys, V.; Wherry, E.; Ahmed, R. (2007) A brief history of CD8 T cells. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S103-10. doi: 10.1002/eji.200737584
 14. Labanieh, L.; Majzner, R.; Mackall, C. (2018) Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng* 2(6): 377–391. doi: 10.1038/s41551-018-0235-9
 15. Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 10024–10028
 16. Kuwana, Y.; Asakura, Y.; Utsunomiya, N.; Nakanishi, M.; Arata, Y.; Itoh, S.; Nagase, F.; Kurosawa, Y. (1987) Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun* 149(3): 960–968. doi: 10.1016/0006-291x(87)90502-x
 17. Irving, B.; Weiss, A. (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64(5): 891–901. doi: 10.1016/0092-8674(91)90314-o

18. Finney, H.; Lawson, A.; Bebbington, C.; Weir, A. (1998) Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 161(6): 2791–2797
19. Maude, S.; Laetsch, T.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M.; Stefanski, H.; Myers, G.; Qayed, M.; Moerlose, B. de; Hiramatsu, H.; Schlis, K.; Davis, K.; Martin, P.; Nemecek, E.; Yanik, G.; Peters, C.; Baruchel, A.; Boissel, N.; Mechinaud, F.; Balduzzi, A.; Krueger, J.; June, C.; Levine, B.; Wood, P.; Taran, T.; Leung, M.; Mueller, K.; Zhang, Y.; Sen, K.; Lebwohl, D.; Pulsipher, M.; Grupp, S. (2018) Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 378(5): 439–448. doi: 10.1056/NEJMoa1709866
20. Neelapu, S.; Locke, F.; Bartlett, N.; Lekakis, L.; Miklos, D.; Jacobson, C.; Braunschweig, I.; Oluwole, O.; Siddiqi, T.; Lin, Y.; Timmerman, J.; Stiff, P.; Friedberg, J.; Flinn, I.; Goy, A.; Hill, B.; Smith, M.; Deol, A.; Farooq, U.; McSweeney, P.; Munoz, J.; Avivi, I.; Castro, J.; Westin, J.; Chavez, J.; Ghobadi, A.; Komanduri, K.; Levy, R.; Jacobsen, E.; Witzig, T.; Reagan, P.; Bot, A.; Rossi, J.; Navale, L.; Jiang, Y.; Aycock, J.; Elias, M.; Chang, D.; Wieszorek, J.; Go, W. (2017) Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377(26): 2531–2544. doi: 10.1056/NEJMoa1707447
21. Davis, K.; Mackall, C. (2016) Immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia: From famine to feast. *Blood Adv* 1(3): 265–269. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000034
22. Maude, S.; Frey, N.; Shaw, P.; Aplenc, R.; Barrett, D.; Bunin, N.; Chew, A.; Gonzalez, V.; Zheng, Z.; Lacey, S.; Mahnke, Y.; Melenhorst, J.; Rheingold, S.; Shen, A.; Teachey, D.; Levine, B.; June, C.; Porter, D.; Grupp, S. (2014) Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med* 371(16): 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222
23. Lee, D.; Gardner, R.; Porter, D.; Louis, C.; Ahmed, N.; Jensen, M.; Grupp, S.; Mackall, C. (2014) Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124(2): 188–195. doi: 10.1182/blood-2014-05-552729

24. Bonifant, C.; Jackson, H.; Brentjens, R.; Curran, K. (2016) Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 3: 16011. doi: 10.1038/mto.2016.11
25. Morgan, R.; Yang, J.; Kitano, M.; Dudley, M.; Laurencot, C.; Rosenberg, S. (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18(4): 843–851. doi: 10.1038/mt.2010.24
26. Ruella, M.; Maus, M. (2016) Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J* 14: 357–362. doi: 10.1016/j.csbj.2016.09.003
27. Wang, Z.; Wu, Z.; Liu, Y.; Han, W. (2017) New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol* 10(1): 53. doi: 10.1186/s13045-017-0423-1
28. Fry, T.; Shah, N.; Orentas, R.; Stetler-Stevenson, M.; Yuan, C.; Ramakrishna, S.; Wolters, P.; Martin, S.; Delbrook, C.; Yates, B.; Shalabi, H.; Fountaine, T.; Shern, J.; Majzner, R.; Stroncek, D.; Sabatino, M.; Feng, Y.; Dimitrov, D.; Zhang, L.; Nguyen, S.; Qin, H.; Dropulic, B.; Lee, D.; Mackall, C. (2018) CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* 24(1): 20–28. doi: 10.1038/nm.4441
29. Liu, K.; Liu, X.; Peng, Z.; Sun, H.; Zhang, M.; Zhang, J.; Liu, S.; Hao, L.; Lu, G.; Zheng, K.; Gong, X.; Di Wu; Wang, F.; Shen, L. (2015) Retargeted human avidin-CAR T cells for adoptive immunotherapy of EGFRvIII expressing gliomas and their evaluation via optical imaging. *Oncotarget* 6(27): 23735–23747. doi: 10.18632/oncotarget.4362
30. Ma, J.; Kim, J.; Kazane, S.; Choi, S.-H.; Yun, H.; Kim, M.; Rodgers, D.; Pugh, H.; Singer, O.; Sun, S.; Fonslow, B.; Kochenderfer, J.; Wright, T.; Schultz, P.; Young, T.; Kim, C.; Cao, Y. (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(4): E450-8. doi: 10.1073/pnas.1524193113
31. Urbanska, K.; Lanitis, E.; Poussin, M.; Lynn, R.; Gavin, B.; Kelderman, S.; Yu, J.; Scholler, N.; Powell, D. (2012) A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res* 72(7): 1844–1852. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890

32. Seitz, C.; Mittelstaet, J.; Hau, J.; Reiter, S.; Illi, C.; Kieble, V.; Engert, Drees, Britta; Bender, G.; Krahl, A.-C.; Knopf, P.; Schroeder, S.; Grote, S.; Paulsen, N.; Rokhvarguer, A.; Atar, D.; Rabsteyn, A.; Schleicher, S.; Schilbach, K.; Kneilling, M.; Pichler, B.; Lock, D.; Kotter, B.; Dapa, S.; Miltenyi, S.; Kaiser, A.; Lang, P.; CMS and JM as well as RH and PS contributed equally (2019) Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting
33. Bonner, W.; Hulett, H.; Sweet, R.; Herzenberg, L. (1972) Fluorescence activated cell sorting. *Review of Scientific Instruments* 43(3): 404–409
34. Herzenberg, L.; Sweet, R. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234(3): 108–117
35. Hélio, T.; Rodrigues, A.; Alves, P.; Coroadinha, A. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. doi: 10.5772/52534
36. Böyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77–89
37. Fuss, I.; Kanof, M.; Smith, P.; Zola, H. (2009) Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol Chapter 7: Unit 7.1*. doi: 10.1002/0471142735.im0701s85
38. Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2): 231–238. doi: 10.1002/cyto.990110203
39. Marques, S.; Esteves da Silva, J. (2009) Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 61(1): 6–17. doi: 10.1002/iub.134
40. Kaatsch P.; Grabow D.; Spix C. (2019) German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz
41. Robert Koch-Institut (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014. RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut)

42. Davila, M.; Riviere, I.; Wang, X.; Bartido, S.; Park, J.; Curran, K.; Chung, S.; Stefanski, J.; Borquez-Ojeda, O.; Olszewska, M.; Qu, J.; Wasielewska, T.; He, Q.; Fink, M.; Shinglot, H.; Youssif, M.; Satter, M.; Wang, Y.; Hosey, J.; Quintanilla, H.; Halton, E.; Bernal, Y.; Bouhassira, D.; Arcila, M.; Gonen, M.; Roboz, G.; Maslak, P.; Douer, D.; Frattini, M.; Giralt, S.; Sadelain, M.; Brentjens, R. (2014) Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 6(224): 224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226
43. Lee, D.; Kochenderfer, J.; Stetler-Stevenson, M.; Cui, Y.; Delbrook, C.; Feldman, S.; Fry, T.; Orentas, R.; Sabatino, M.; Shah, N.; Steinberg, S.; Stroncek, D.; Tschernia, N.; Yuan, C.; Zhang, H.; Zhang, L.; Rosenberg, S.; Wayne, A.; Mackall, C. (2015) T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385(9967): 517–528. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3
44. Schlegel, P.; Lang, P.; Zugmaier, G.; Ebinger, M.; Kreyenberg, H.; Witte, K.-E.; Feucht, J.; Pfeiffer, M.; Teltschik, H.-M.; Kyzirakos, C.; Feuchtinger, T.; Handgretinger, R. (2014) Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab. *Haematologica* 99(7): 1212–1219. doi: 10.3324/haematol.2013.100073
45. Brudno, J.; Kochenderfer, J. (2016) Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: Recognition and management. *Blood* 127(26): 3321–3330. doi: 10.1182/blood-2016-04-703751
46. D'Aloia, M.; Zizzari, I.; Sacchetti, B.; Pierelli, L.; Alimandi, M. (2018) CAR-T cells: The long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis* 9(3): 282. doi: 10.1038/s41419-018-0278-6
47. Baskar, S.; Wiestner, A.; Wilson, W.; Pastan, I.; Rader, C. (2012) Targeting malignant B cells with an immunotoxin against ROR1. *MAbs* 4(3): 349–361. doi: 10.4161/mabs.19870
48. Hudecek, M.; Lupo-Stanghellini, M.-T.; Kosasih, P.; Sommermeyer, D.; Jensen, M.; Rader, C.; Riddell, S. (2013) Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen

- receptor T cells. *Clin Cancer Res* 19(12): 3153–3164. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330
49. Maude, S.; Teachey, D.; Rheingold, S.; Shaw, P.; Aplenc, R.; Barrett, D.; Barker, C.; Callahan, C.; Frey, N.; Nazimuddin, F.; Lacey, S.; Zheng, Z.; Levine, B.; Melenhorst, J.; Motley, L.; Porter, D.; June, C.; Grupp, S. (2016) Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *JCO* 34(15_suppl): 3011. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3011
 50. Majzner, R.; Mackall, C. (2018) Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* 8(10): 1219–1226. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0442
 51. Fischer, J.; Paret, C.; El Malki, K.; Alt, F.; Wingerter, A.; Neu, M.; Kron, B.; Russo, A.; Lehmann, N.; Roth, L.; Fehr, E.-M.; Attig, S.; Hohberger, A.; Kindler, T.; Faber, J. (2017) CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother* 40(5): 187–195. doi: 10.1097/CJI.0000000000000169
 52. Sotillo, E.; Barrett, D.; Black, K.; Bagashev, A.; Oldridge, D.; Wu, G.; Sussman, R.; Lanauze, C.; Ruella, M.; Gazzara, M.; Martinez, N.; Harrington, C.; Chung, E.; Perazzelli, J.; Hofmann, T.; Maude, S.; Raman, P.; Barrera, A.; Gill, S.; Lacey, S.; Melenhorst, J.; Allman, D.; Jacoby, E.; Fry, T.; Mackall, C.; Barash, Y.; Lynch, K.; Maris, J.; Grupp, S.; Thomas-Tikhonenko, A. (2015) Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov* 5(12): 1282–1295. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020
 53. Gardner, R.; Wu, D.; Cherian, S.; Fang, M.; Hanafi, L.-A.; Finney, O.; Smithers, H.; Jensen, M.; Riddell, S.; Maloney, D.; Turtle, C. (2016) Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* 127(20): 2406–2410. doi: 10.1182/blood-2015-08-665547
 54. Jacoby, E.; Nguyen, S.; Fountaine, T.; Welp, K.; Gryder, B.; Qin, H.; Yang, Y.; Chien, C.; Seif, A.; Lei, H.; Song, Y.; Khan, J.; Lee, D.; Mackall, C.; Gardner, R.; Jensen, M.; Shern, J.; Fry, T. (2016) CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute

- lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun* 7: 12320. doi: 10.1038/ncomms12320
55. Watanabe, K.; Terakura, S.; Martens, A.; van Meerten, T.; Uchiyama, S.; Imai, M.; Sakemura, R.; Goto, T.; Hanajiri, R.; Imahashi, N.; Shimada, K.; Tomita, A.; Kiyoi, H.; Nishida, T.; Naoe, T.; Murata, M. (2015) Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor-modified effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* 194(3): 911–920. doi: 10.4049/jimmunol.1402346
 56. Sampson, J.; Choi, B.; Sanchez-Perez, L.; Suryadevara, C.; Snyder, D.; Flores, C.; Schmittling, R.; Nair, S.; Reap, E.; Norberg, P.; Herndon, J.; Kuan, C.-T.; Morgan, R.; Rosenberg, S.; Johnson, L. (2014) EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. *Clin Cancer Res* 20(4): 972–984. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0709
 57. Hegde, M.; Mukherjee, M.; Grada, Z.; Pignata, A.; Landi, D.; Navai, S.; Wakefield, A.; Fousek, K.; Bielamowicz, K.; Chow, K.; Brawley, V.; Byrd, T.; Krebs, S.; Gottschalk, S.; Wels, W.; Baker, M.; Dotti, G.; Mamonkin, M.; Brenner, M.; Orange, J.; Ahmed, N. (2016) Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest* 126(8): 3036–3052. doi: 10.1172/JCI83416
 58. Bielamowicz, K.; Fousek, K.; Byrd, T.; Samaha, H.; Mukherjee, M.; Aware, N.; Wu, M.-F.; Orange, J.; Sumazin, P.; Man, T.-K.; Joseph, S.; Hegde, M.; Ahmed, N. (2018) Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro-oncology* 20(4): 506–518. doi: 10.1093/neuonc/nox182
 59. Lohmueller, J.; Ham, J.; Kvorjak, M.; Finn, O. (2017) mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology* 7(1): e1368604. doi: 10.1080/2162402X.2017.1368604
 60. Roll, P.; Palanichamy, A.; Kneitz, C.; Dorner, T.; Tony, H.-P. (2006) Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(8): 2377–2386. doi: 10.1002/art.22019
 61. Stiehm, E. (2013) Adverse effects of human immunoglobulin therapy. *Transfus Med Rev* 27(3): 171–178. doi: 10.1016/j.tmr.2013.05.004

2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| • Abb. I-1 Schema der Hämatopoese..... | 3 |
| • Abb. I-2 Entwicklungsstadien der B-Zelllinie | 6 |
| • Abb. I-3 Struktur eines Antikörpers..... | 8 |
| • Abb. I-4 B-Zell-Erkrankungen und ihre Ursprungszelle | 9 |
| • Abb. I-5 Aufbau des CAR..... | 13 |
| • Abb. I-6 Aufbau des AdCAR..... | 17 |
| • Abb. II-1 Funktionsweise des Durchflusszytometers..... | 28 |
| • Abb. II-2 Auftrennung der Blutbestandteile | 33 |
| • Abb. II-3 Prinzip der Zellseparation mit MACS-Technologie..... | 35 |
| • Abb. II-4 a) Gating-Strategie anhand der Mock-T-Zellen b) LNGFR- Expression der transduzierten T-Zellen mit CD4/CD8-Verteilung..... | 38 |
| • Abb. II-5 Beispiel einer Vergleichsgerade für die Zuordnung der Counts zum entsprechenden Lysewert..... | 42 |
| • Abb. II-6 Gating-Strategie bei FACS-basierten Kill-Assays..... | 45 |
| • Abb. III-1 a) Gating-Strategie anhand JeKo-1 Wildtyp b) FACS-Screening aller JeKo-1-Varianten | 48 |
| • Abb. III-2 a) Kontrollen b) FACS-Screening am Beispiel von JeKo-1 Wildtyp | 50 |
| • Abb. III-3 Zeitliche Entwicklung der Luciferase-Aktivität..... | 53 |
| • Abb. III-4 Zellzahl-Titration von JeKo-1-Varianten..... | 54 |
| • Abb. III-5 E:T-Titration von JeKo-1..... | 55 |
| • Abb. III-6 Titration der Antikörper-Konzentrationen..... | 56 |
| • Abb. III-7 AdCAR-T-Zellen mit bCD19 und bCD20 vs. JeKo-1 | 61 |
| • Abb. III-8 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 Wildtyp | 62 |
| • Abb. III-9 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 CD19KO | 63 |
| • Abb. III-10 FACS-basierter Kill-Assay mit AdCAR-T-Zellen und bCD19 / bCD20 vs. JeKo-1 CD20KO | 64 |

- Abb. III-11 Entwicklung der Lyse über die Zeit.....65
- Abb. III-12 Vergleich der Lysewerte verschiedener Spender67
- Abb. III-13 Vergleich konventioneller CAR-T-Zellen mit AdCAR-T-Zellen a) Verschiedene CAR-Arten vs. JeKo-1 Wildtyp und JeKo-1 CD19KO b) Darstellung mit Fokus auf CD19 als Target-Antigen70
- Abb. III-14 Lyse von JeKo-1 durch Kombination mehrerer Antikörper a) zwei Antikörper b) drei Antikörper c) alternativer Antikörper d) Kontrollen.....74
- Abb. III-15 Verteilung der JeKo-1-Varianten im FACS-Plot75
- Abb. III-16 FACS-basierter Kill-Assay mit Antikörper-Kombinationen77
- Abb. III-17 Schrittweise Elimination von Tumorzell-Populationen im FACS-basierten Kill-Assay mit JeKo-1 Wildtyp und CD19KO.....79
- Abb. III-18 Schrittweise Elimination von Tumorzell-Populationen im FACS-basierten Kill-Assay mit JeKo-1 Wildtyp und CD20KO.....80
- Abb. III-19 Aktivierung der AdCAR-T-Zellen mittels Surface Activation Matrix82
- Abb. III-20 Antikörper-Titration Teil 183
- Abb. III-21 Antikörper-Titration Teil 284
- Abb. III-22 Antikörper-Titration mit Kombinationen86
- Abb. IV-1 Säulen der AdCAR-T-Zell-Therapie90
- Abb. IV-2 Die Tumorlyse durch AdCAR-Zellen ist steuerbar.....95
- Abb. IV-3 Arten der Immunevasion von Tumoren99
- Abb. IV-4 Schonung gesunder Gewebe durch spezifische Lyse von Tumorzellen mittels Surface Activation Matrix..... 104

3. Tabellenverzeichnis

- Tab. II-1 Zusammenfassung der benötigten Mischverhältnisse beim Luciferase-basierten Kill-Assay41
- Tab. II-2 Graphische Darstellung der Signifikanz43
- Tab. III-1 Auswertung des FACS-Screenings (CD19 und CD20).....49
- Tab. III-2 Auswertung des FACS-Screenings (ROR1, CD22, CD79b, CD276)51
- Tab. III-3 Ergebnisse des Kill-Assays mit bCD19 und bCD20: Reine Lyse nach 48 Stunden59
- Tab. III-4 Übersicht der Ergebnisse der Kill-Assays zum Vergleich konventioneller CAR-T-Zellen mit AdCAR-T-Zellen68
- Tab. III-5 Ergebnisse des Kill-Assays mit den Kombinationen aus bCD19, bCD20 und bROR1: Reine Lyse nach 48h.....72

VII. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen unter Betreuung von Herrn Dr. Patrick Schlegel, Herrn Dr. Christian Seitz und Herrn Prof. Dr. Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung von Sarah Schröder und Giulia Bender von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Patrick Schlegel eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Teile dieser Arbeit wurden als Manuskript bereits bei einem Journal zur Publikation eingereicht und sind entsprechend gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um das Manuskript *Seitz, Mittelstaet, Hau, Reiter et al. – Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting.*

Tübingen, den 27.01.2020

VIII. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt folgenden Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben:

Dr. Patrick Schlegel, Dr. Christian Seitz und Prof. Dr. Peter Lang für die professionelle Betreuung und Beratung bei der experimentellen Arbeit und der Verschriftlichung meiner Ergebnisse sowie das Feedback, die Anregungen und die Denkanstöße.

Dr. Patrick Schlegel, dem ich auch die Aufnahme in das IZKF-Promotionskolleg verdanke, für den stets engagierten persönlichen Umgang, den großen Optimismus und die unerschöpflichen Ideen in der klinischen Forschung.

Sarah Schröder, Giulia Bender und Stephanie Zug für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit im Labor und die aufwendige Einarbeitung in die Thematik, Florian Heubach für die kompetente Einführung in die Kunst des FACS – und allen für die daraus entstandene Freundschaft und die schöne Atmosphäre im Labor.

Allen beteiligten Mitarbeitern in der Kinderklinik für die Einarbeitung in die Geräte, die Beantwortung aller Fragen und das kollegiale Miteinander.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden für das Korrekturlesen, die vielen aufbauenden Worte, die offenen Ohren und die moralische Unterstützung, wenn es im Labor mal wieder später wurde oder Dinge nicht so funktioniert haben, wie ich mir das vorgestellt hatte.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur während meiner Dissertation, sondern während meiner gesamten schulischen und universitären Laufbahn unterstützt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir bei all meinen Entscheidungen den Rücken stärkt.