

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

**Synchrones Immunotargeting mit Adapter CAR-T-
Zellen (AdCAR-T) zur Therapie der Akuten Myeloischen
Leukämie (AML)**

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

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

**vorgelegt von
Kieble, Verena Sonja**

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 20.12.2021

*Meinen Eltern
In großer Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
I. Einleitung	1
1. Akute Myeloische Leukämie	2
2. CAR-T-Zellen	6
3. Potenzielle Zielantigene zur Therapie der AML	8
4. Herausforderung der CAR-T-Zell-Therapie	11
5. Adapter CAR-T-Zellen (AdCAR-T-Zellen)	14
6. Surface-Activation-Matrix (SAM)	18
7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
II. Material und Methoden	21
1. Zellkultur	21
1.1. Zelllinien	21
1.2. Zellpflege	22
1.3. Einfrieren (Kryokonservierung) und Auftauen	23
2. Herstellung von AdCAR-T-Zellen	24
2.1. Ficoll: Isolierung der PBMCs	25
2.2. MACS: Trennung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen	26
2.3. Stimulation der T-Zellen	28
2.4. Transduktion (Tag 1)	28
2.5. TransACT-Verdünnung (Tag 3)	28
2.6. Umfüllen in Zellkulturflaschen (Tag 4)	28
2.7. LNGFR-FC	29
2.8. LNGFR-MACS (Optional)	32
2.9. Herstellung zytokinfreier AdCAR-T-Zellen	32
3. Luciferase-basierter Zytotoxizitäts-Assay	33
3.1. E:T-Titration	36
3.2. Antikörper-Titration	36
3.3. Antikörper-Kombination	37
4. FC-Analyse	38
5. Statistische Auswertung	39
6. Materialliste	40

III. Ergebnisse	45
1. Charakterisierung der Tumorzellen	47
1.1. Fluoreszenz-Testung	47
1.2. Antigenexpression.....	49
1.3. MFI und MFIR	51
2. Qualitätskontrolle der AdCAR-T-Zellen	52
3. Normalisierung der AdCAR-T-Zellen	54
4. Luciferase-basierte Zytotoxizitäts-Assays	55
4.1. HL-60	55
4.1.1. E:T-Titration.....	55
4.1.2. Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)	56
4.1.3. Antikörpertitration (10 pg/ml – 1000 pg/ml)	58
4.1.4. Antikörperkombination	60
4.2. U-937	61
4.2.1. E:T-Titration.....	61
4.2.2. Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)	62
4.2.3. Antikörpertitration (10 pg/ml – 200 pg/ml).....	64
4.2.4. Antikörperkombination	66
4.3. MOLM-13	67
4.3.1. E:T-Titration.....	67
4.3.2. Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)	68
4.3.3. Antikörpertitration (10 pg/ml – 1000 pg/ml)	70
4.3.4. Antikörperkombination	72
IV. Diskussion	73
1. Die Relevanz neuer Therapiestrategien	74
2. Die AdCAR-Technologie im Vergleich	76
3. Surface-Activation-Matrix	82
4. Die Heterogenität der AML.....	85
5. Limitationen und Herausforderungen	87
V. Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis	98
Erklärung zum Eigenanteil	110
Danksagung	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Hämatopoese.....	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR).....	7
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines konventionellen CARs und eines Adapter-CARs.....	15
Abbildung 4: Tumorlyse durch ein Adapter-CAR (AdCAR) durch synchrones Targeting mehrerer Antigene	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Target-Zell-Identifizierung und Lyse durch Integration von Expressionsprofilen	19
Abbildung 6: Herstellung von AdCAR-T-Zellen	24
Abbildung 7: Isolierung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation.....	25
Abbildung 8: Positive Selektion CD4 ⁺ -Zellen durch MACS-Technik	26
Abbildung 9: FC Gating-Strategie und LNGFR-Expression der MOCK-T- Zellen und AdCAR-T-Zellen mit CD4/CD8-Verteilung	31
Abbildung 10: Luciferase-Reaktion.....	33
Abbildung 11: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP im FC-Versuch.....	48
Abbildung 12: Antigenexpression ausgewählter biotinylierter Antikörper auf den Tumorzellen	50
Abbildung 13: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP im FCS-Versuch.....	53
Abbildung 14: HL-60 E:T:Titration	55
Abbildung 15: HL-60 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml	56
Abbildung 16: HL-60 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 1000 pg/ml	58
Abbildung 17: HL-60 Antikörperkombination	60

Abbildung 18: U-937 E:T-Titration	61
Abbildung 19: U-937 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml	62
Abbildung 20: U-937 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 200 pg/ml	64
Abbildung 21: U-937 Antikörperkombination	66
Abbildung 22: MOLM-13 E:T-Titration.....	67
Abbildung 23: MOLM-13 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml.....	68
Abbildung 24: MOLM-13 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 1000 pg/ml.....	70
Abbildung 25: MOLM-13 Antikörperkombination	72
Abbildung 26: AdCAR-Erkennung und Aktivierung	77
Abbildung 27: Identifizierung und Tumorlyse durch Integration von Expressionsprofilen	83
Abbildung 28: Antigen Koexpression in normalen Geweben.....	88
Abbildung 29: Differentielles Targeting und Tumorlyse durch AdCAR-T-Zellen	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeines Titrationsschema für Luciferase-Assays auf einer 96-Well-Platte	34
Tabelle 2: Konditionen des allgemeinen Titrationsschemas der Luciferase-Assays für eine 96-Well-Platte	34
Tabelle 3: Titrationsschema E:T-Titration auf einer 96-Well-Platte	36
Tabelle 4: Titrationsschema Antikörpertitration auf einer 96-Well-Platte	36
Tabelle 5: Titrationsschema Antikörperkombination auf einer 96-Well-Platte ..	37
Tabelle 6: Graphische Darstellung der Signifikanzniveaus	39
Tabelle 7: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP in Prozent (%)	47
Tabelle 8: Antigenexpression ausgewählter biotinylierter Antikörper auf Leukämiezellen	49
Tabelle 9: Mean Fluorescence Intensity verschiedener biotinylierter Antikörper auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13	51
Tabelle 10: Mean Fluorescence Intensity Ratio verschiedener biotinylierter Antikörper in Bezug zum Kontrollantikörper Anti-Biotin-APC auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13.....	51
Tabelle 11: AdCAR-T-Zell-Expansionen (Nr. 1 bis 20), Spender (D1-D6), LNGFR-Expression in % und CD4-CD8-Verteilung in %	54

Abkürzungsverzeichnis

AdCAR	Adapter Chimeric Antigen Receptor
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AM	Adaptermolekül
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
b	biotinyliert
BiTE	bispecific T-cell engagers
bmAb	biotinylated monoclonal Antibody
BUV	Brilliant Ultraviolet
CAR	Chimeric Antigen Receptor
Cas	CRISPR-associated
CD	Cluster of differentiation
CLEC12A	C-type lectin domain family 12 member A
CLL-1	C-type lectin-like molecule-1
CRISPR	Cluster Regularly Interspaced Short Palindrom Repeats
CRS	Cytokine Release Syndrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E:T-Ratio	Effector cell to target cell ratio
Fab	antigen-binding fragment

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FC	Flow Cytometry
Fc	Fragment, crystallizable
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FSC	Forward light scatter
g	Relative Erdbeschleunigung
GvH	Graft-versus-Host
HLA	Human Leukocyte Antigen
IDH	Isocitratdehydrogenase
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
LAIR1	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
LLE	Linker Label Epitope
LLE-AM	Linker Label Epitope Adapter Molecule
LNGFR	Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor
mAb	Monoclonal Antibody
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting

MFI	Median Fluorescence Intensity
MFIR	Median Fluorescence Intensity Ratio
MHC	Major Histocompatibility Complex
MP	MACS Puffer
MRD	Minimal Residual Disease
n	Anzahl der Einzelmessungen
NAD ⁺	Adenosindiphosphat
NADP ⁺	2'-Phospho-Adenosindiphosphat
ns	not significant
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
P/S	Penicillin/Streptomycin
r	Bremse
RES	Retikuloendotheliales Systems
RT	Raumtemperatur
S	Seite
SAM	Surface Activation Matrix
scFv	Single chain variable fragment
SSC	Sideward light scatter
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

I. Einleitung

Zu Beginn der Einleitung wird ein Überblick über die Erkrankung akute myeloische Leukämie gegeben. Es werden die Grundlagen erklärt, die zum Verständnis der Dissertation beitragen. Anschließend wird das CAR-System (chimeric antigen receptor) mit seinen Stärken und Schwächen dargestellt und mögliche Zielantigene zur Therapie besprochen. Es folgt eine genauere Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten, erweiterten CAR-Systems, des Adapter-CAR-Systems. Am Ende wird die Zielsetzung der Arbeit definiert.

Im zweiten Kapitel sind die verwendeten Materialien aufgelistet und die Methoden erläutert.

Im dritten Teil der Dissertation werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt, die anschließend in Kapitel vier in Bezug zum aktuellen Stand der Forschung und der Zielsetzung dieser Arbeit diskutiert werden. Zuletzt folgt eine kurze Zusammenfassung.

1. Akute Myeloische Leukämie

Hinter dem Begriff Leukämie, auch Blutkrebs genannt, verbirgt sich nicht nur eine definierte einzelne Erkrankung, sondern vielmehr eine Gruppe verschiedener Erkrankungen, die sich in ihrer Entstehung, ihrer Symptomatik, ihrem Verlauf und ihrer Prognose stark voneinander unterscheiden. Die Bezeichnung Leukämie beinhaltet verschiedene Krebserkrankungen des blutbildenden Systems. Es findet eine klonale Expansion unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark statt, die gleichzeitig die Produktion gesunder Blutzellen einschränkt. Die akute Leukämie ist eine akute, lebensbedrohliche Erkrankung, wohingegen chronische Leukämien einen Verlauf über Jahre bis Jahrzehnte aufweisen können. Je nach Vorläuferzelllinie, von der die entarteten Zellen abstammen, lässt sich die akute myeloische Leukämie (AML) von der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) unterscheiden.

Die AML macht circa 80% aller Leukämien beim Erwachsenen und 13,5% der Leukämien im Kindesalter aus [1]. Statistisch lassen sich zwei Erkrankungsgipfel erkennen, zum einen im frühen Kindesalter, zum anderen im hohen Erwachsenenalter. Insgesamt ist die AML mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 68 Jahren eine Erkrankung des höheren Lebensalters [2].

Mit einer Inzidenz von 3,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr zählt die AML zu den seltenen Erkrankungen [3]. Die genauen Zahlen variieren weltweit abhängig von Herkunftsland, ethnischer Abstammung und weiteren, teilweise noch unbekanntem Umweltfaktoren. In den USA konnte in den letzten 10 Jahren eine progressive Erhöhung der Inzidenz auf aktuell 4,3 Neuerkrankungen pro 100.000 pro Jahr aufgezeichnet werden [4]. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 0,05% [4, 5]. Männer sind im Durchschnitt etwa 1,6-mal häufiger betroffen als Frauen [2].

Die AML ist keine homogene Erkrankung. Es gibt verschiedene Unterformen, deren Entstehungsmechanismen sich voneinander unterscheiden, wodurch gleichzeitig Potential für verschiedene Ansätze zur gezielten Therapie geschaffen wird. Am häufigsten tritt die AML de novo (lat. von neuem) auf. Die Entstehung kann jedoch auch sekundär erfolgen und durch verschiedene Aspekte beeinflusst werden. Dabei spielen Umweltfaktoren wie Rauchen, die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, die chronische Belastung mit Benzol oder Zytostatika wie Alkylanzien und Etoposid eine besondere Rolle [6, 7]. Molekulargenetisch wurden verschiedene genetische Mutationen wie die IDH-Mutation (Isocitrat-Dehydrogenase) oder die FLT3-Mutation (fms like tyrosine kinase 3) identifiziert, die ebenfalls als Angriffspunkte neuer Therapien dienen [8, 9].

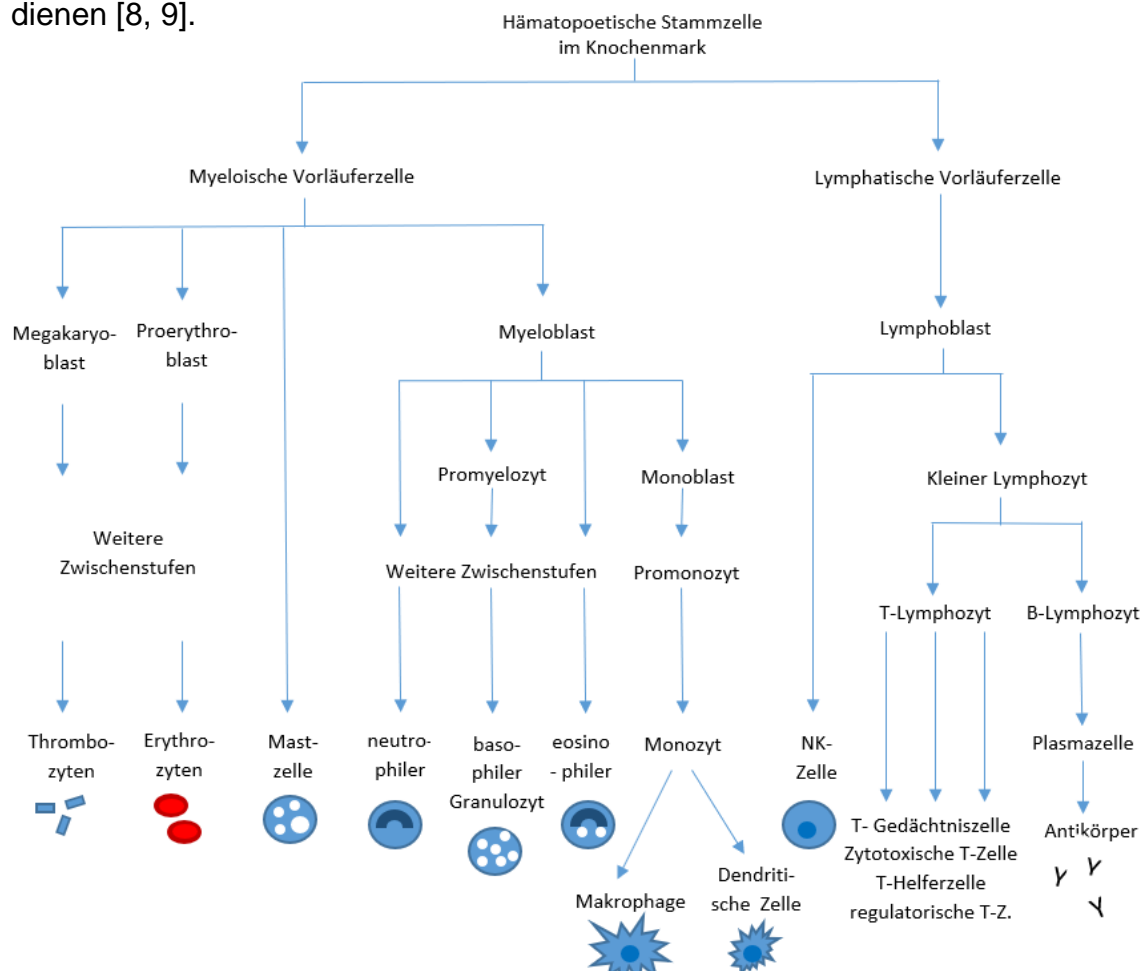


Abbildung 1: Die Hämatopoese

Das Schaubild zeigt eine hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark, aus der die myeloische und die lymphatische Vorläuferzellen hervorgehen. Jene differenzieren sich weiter zu den verschiedenen Blutzellen des menschlichen Körpers.

Die gestörte Blutbildung führt zu einer Depletion der physiologischen Blutbestandteile der myeloischen Reihe, deren Abstammungslinie in Abbildung 1 (S 3) schematisch dargestellt ist. Als Folge der Depletion ist ein Mangel an Erythrozyten, blutstillenden Thrombozyten und weiterer funktionstüchtiger Immunzellen zu erwarten. Die daraus resultierenden Symptome sind unspezifisch und vielfältig. Häufig tritt die tumorassoziierte Fatigue als Erstsymptom auf [10]. Allgemeinsymptome wie Fieber, Anorexie, Appetits- und Gewichtsverlust sind häufig. Dominierend zeigt sich die Anämie durch Müdigkeit, Blässe und Leistungsminderung, die Neutropenie durch eine erhöhte Infektneigung und die Thrombozytopenie durch Ekchymosen, Petechien und Epistaxis [6]. Weitere körperliche Zeichen können eine Hepatosplenomegalie, eine Lymphadenopathie und diffuse Knochenschmerzen sein [6]. Bei einer massiven Leukozytose >100.000 Zellen/ μl besteht die Gefahr der Leukostase, woraus eine Hypoxie, pulmonale Verschattungen, retinale Einblutungen und neurologische Symptomen resultieren können [6].

Aufgrund dieser Komplikationen ist die AML eine schwere Erkrankung, die unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tode führen kann. Folglich ist es wichtig, nach der Diagnosestellung umgehend eine Therapie einzuleiten. Zur Therapie stehen verschiedene Ansätze wie Chemotherapien mit Zytostatika oder eine Stammzelltransplantation zur Verfügung [11]. Strahlentherapien spielen bislang eine untergeordnete Rolle. Trotz großer Bemühungen in der Entwicklung neuer Therapieprinzipien wie Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Midostaurin, Sorafenib, Dasatinib), monoklonaler Antikörper (z.B. Gemtuzumab-Ozogamicin) oder IDH-Inhibitoren konnten diese bislang die Standardtherapie keinesfalls ersetzen und werden nur in ausgewählten Fällen in Kombination zur Chemotherapie angewandt [12-14].

Trotz der zahlreichen Therapiemöglichkeiten, der jeweiligen individuellen Tumoreigenschaften und unterschiedlichen Entstehungsmechanismen werden die AML-Unterarten meist nach demselben Prinzip in zwei Schritten behandelt [11]. Zunächst erfolgt die Induktionstherapie mit Chemotherapeutika, in der Regel bestehend aus einer Kombination aus Cytarabin und einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin), wodurch bei den unter 60-jährigen verhältnismäßig gute

vorübergehende Heilungsraten erzielt werden können [11]. Die Chemotherapeutika sind jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Mukositis, Knochenmarksdepression und Neuropathien verbunden [15]. Bei den Anthrazyklinen spielt insbesondere die Kardiotoxizität eine kritische Rolle [16]. Im Zweiten Schritt erfolgt die Postremissionstherapie, bei der individuell zwischen Chemotherapie, Stammzelltransplantation und neuen alternativen Methoden abgewogen wird. Die beste Prävention, um einem Rezidiv vorzubeugen, stellt bislang die allogene Stammzelltransplantation dar [17].

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Leukämieformen ist ersichtlich, dass die AML für einen Großteil der Toten durch Leukämien (62 %) verantwortlich ist [18]. Das Alter bei Diagnosestellung hat prognostisch eine große Relevanz in Bezug auf das Langzeitüberleben. Im Kindesalter kann durch intensive Chemotherapie eine bessere Prognose mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 72% erreicht werden [1]. Dies sind deutlich bessere Aussichten als im Erwachsenenalter. Hier liegt laut dem SEER National Cancer Institute die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate in den Jahren 2010 bis 2016 bei nur 28,7% [4]. Ältere Menschen haben ein beträchtlich schlechteres Outcome aufgrund resistenterer Zellen und einer schwereren Therapie mit einer erhöhten behandlungsbezogenen Mortalität [6]. Patienten, deren Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert wurde, haben eine 5-Jahres-Lebenserwartung von 58,2 %, was etwa fünfmal länger ist als bei Menschen, deren Diagnose mit 65 Jahren oder Älter gestellt wird [2].

Im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen dieser Zeit, in deren Behandlung durch neue Therapien teilweise große Erfolge verzeichnet werden konnten, haben sich diese Zahlen über die letzten Jahre und Jahrzehnte nicht grundlegend verändert [11]. Mit einer mittleren Überlebensrate von 8,5 Monaten stellt die AML immer noch eine der tödlichsten Krebserkrankungen dar [2]. Dies verstärkt die Intention, an neuen, besseren und insbesondere individualisierten Therapiemöglichkeiten zu forschen, um den Patienten ein sowohl qualitativ als auch quantitativ besseres Langzeitüberleben zu ermöglichen.

2. CAR-T-Zellen

In den letzten Jahren wird den CAR-T-Zellen (Chimeric Antigen Receptor T Cells) in unterschiedlichen Bereichen der Tumorthherapie immer mehr Bedeutung zugesprochen. CAR-T-Zellen sind T-Zellen, die mittels Gentransfer derart verändert werden, dass sie einen artifiziellen Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimieren.

Zur Herstellung der CAR-T-Zellen werden T-Zellen aus dem Blut des Patienten isoliert. Mittels eines Gentransfers z.B. mit Hilfe eines Virus (Retro-/Lenti-/Adenovirus) wird die synthetische Gensequenz in das Genom der T-Zelle integriert. CARs sind rekombinante Oberflächenrezeptoren. Sie setzen sich aus 4 Teilen zusammen: 1. Dem antigenspezifischen extrazellulären Anteil scFv (single chain of variable region) aus dem variablen Teil einer leichten und einer schweren Immunglobulinkette, die durch ein kurzes Peptid verbunden sind, 2. einer Brückendomäne (engl. spacer) aus IgG, CD8 α oder CD28, der eine Verbindung zur Transmembrandomäne (3.) herstellt, die meist aus CD28 gebildet wird, und 4. aus einer intrazellulären Domäne, vorzugsweise der CD3 ζ Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) [19]. Da die Bindungsdmäne (scFv) von einem Antikörper, meist Murin, abgeleitet wird, nennt man es einen chimären Antigen-Rezeptor [20]. Dank dieser Struktur können CARs im Gegensatz zu natürlichen T-Zellen nicht MHC restringierte Antigene erkennen [21].

Die Zellen werden zur Therapie in den Patienten zurückgegeben und sind damit ein „lebendes Medikament“. Bindet das CAR an ein Tumor-assoziiertes Zielantigen auf einer Zelle (gesunde Zelle oder Tumorzelle), wird diese durch die Aktivierung einer Signalkaskade, einer resultierenden Zytokinsekretion und Freisetzung lytischer Granula mit Perforin und Granzym lysiert [22].

Im Laufe des CAR-T-Zell-Designs wurden verschiedene Variationen und Innovationen geschaffen. Aktuell unterscheidet man CARs der ersten, zweiten, dritten und vierten Generation. Die erste Generation besteht aus der scFv, einer Brückendomäne, einer Transmembrandomäne und einer Signalkette. Die zweite Generation CARs besitzen zusätzlich zur signalvermittelnden CD3 ζ Kette des TCR noch eine costimulatorische Einheit, beispielsweise CD28,

CD27, OX40 oder 4-1BB [23]. Die dritte Generation der CARs enthält zwei costimulatorische Einheiten hintereinandergeschaltet, um eine weitere Signalverstärkung zu erreichen. Unter CARs der vierten Generation versteht man CAR-T-Konstrukte, die neben der beschriebenen CAR-Funktion zusätzlich auf eine CAR-vermittelte Aktivierung zu einer Freisetzung von Zytokinen führt [24, 25]. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau je eines CARs der vier Generationen in Anlehnung an Abken, 2017 [25].

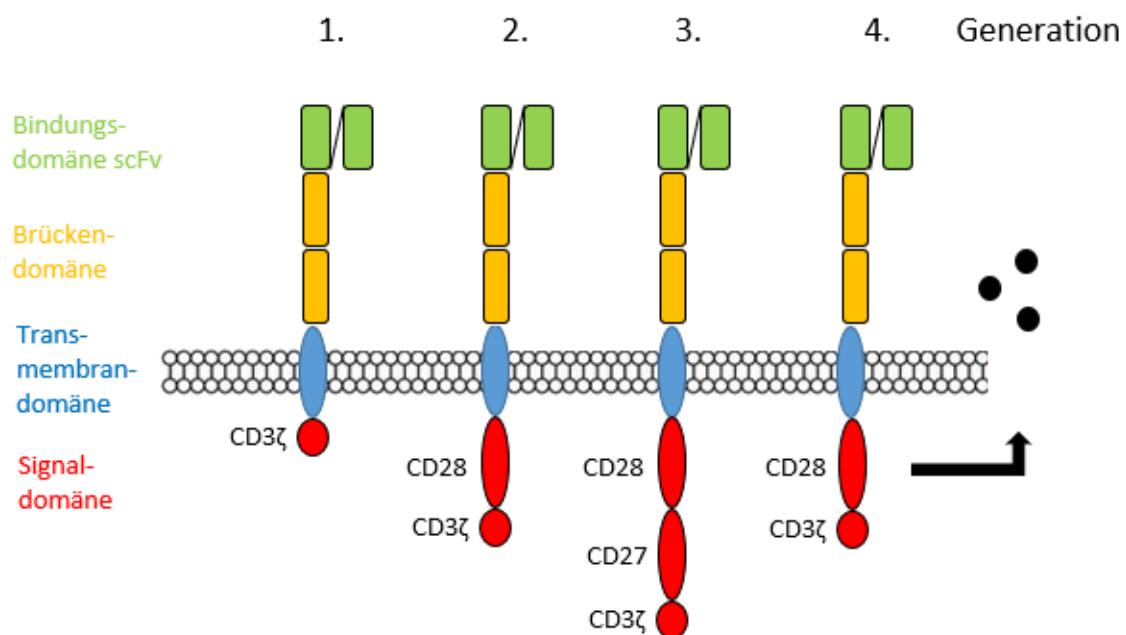


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR)

Ein CAR der 1. Generation besteht aus einer Bindungsdomäne (hier dem scFv, single chain fragment of variable region), einer Brückendomäne, einer Transmembrandomäne und einer Signalkette (hier die CD3 ζ Kette des TCR). Ein CAR der 2. Generation besitzt zusätzlich eine costimulatorische Einheit (z.B. CD28, 4-1BB, OX40). Ein CAR der 3. Generation besitzt 2 costimulatorische Einheiten. Ein CAR der 4. Generation ist ein CAR kombiniert mit CAR-induzierter Zytokinfreisetzung (schwarze Punkte) nach Bindung an die Zielzelle. (In Anlehnung an Abken, 2017)

Thema aktueller Forschung sind neuartige CAR-Konstrukte wie dual-targeting T-Zellen, wobei eine CAR-T-Zelle zwei verschiedene antigenspezifische CARs exprimiert [26], ebenso wie bispezifische CAR-T-Zellen, die für zwei verschiedene Antigene spezifisch sind [27]. Des Weiteren werden CAR-Designs mit „Suicide Gen“ (engl. Selbstmord-Gen) mit der Intention untersucht, eine bessere Kontrolle & Steuerung der Toxizität zu bewirken [28].

3. Potenzielle Zielantigene zur Therapie der AML

Um eine effiziente Therapie der AML zu erreichen, können verschiedene Oberflächenmoleküle (Antigene) der Tumorzellen, durch Antikörper angegriffen werden. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass jede AML ihren eigenen Charakter besitzt und eine große Variabilität in der Expression von Oberflächenmarkern besteht [29-31]. Bestimmte Marker werden von nahezu allen AMLs exprimiert. Ein optimales Target wäre eine Struktur auf der Oberfläche maligner Zellen, die immunogen ist, das Potenzial hat, einen klinischen Effekt zu bewirken, bei vielen Patienten vorkommt und eine kritische Rolle in der Differenzierung und Proliferation maligner Zellen spielt. Dabei sollte das Target sowohl auf malignen Tumorzellen als auch auf den Vorläuferzellen, nicht aber auf gesundem Gewebe exprimiert sein [32]. Bei der Auswahl der Targets zur Therapie der AML gestaltet sich dies als schwierig, da ein Großteil der Antigene auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und gesundem Gewebe exprimiert wird [31]. Im Folgenden werden relevante Oberflächenantigene näher charakterisiert, die als mögliche Zielantigene in der Therapie der AML aktuell Anwendung finden oder in Zukunft finden könnten.

CD33: CD33 gehört zur Gruppe der Siglecs, der sialic acid-binding immunoglobulin-like lectines [33]. Es ist ein Transmembranrezeptor, der sich hauptsächlich auf Zellen der myeloischen Reihe befindet und bei bis zu 90 % der leukämischen Blasten exprimiert wird [34, 35]. Somit stellt es aktuell das Antigen der Wahl zur Therapie der AML dar. CD33 ist das Target von Gemtuzumab-Ozogamicin, einem humanen, monoklonalen anti-CD33-Antikörper. Das Arzneimittel war von 2000 bis 2010 zugelassen, bis es aufgrund zahlreicher Todesfälle als Folge unerwünschter Wirkungen wie Knochenmarkstoxizität und Lebervenenverschlusskrankheit wieder vom Markt genommen wurde. Im Jahr 2017 wurde es basierend auf Daten neuer Studien, welche geringere Rezidivraten und verlängerte Überlebenszeit zeigten, erneut zur Therapie der AML zugelassen [14, 36]. Die Therapie mit CD33-spezifischen CAR-T-Zellen gewinnt immer mehr an Aufmerksamkeit. Aktuell befinden sich hierzu verschiedene Studien in der klinischen Phase I, II und III [37, 38].

CD38: Ein weiterer Oberflächenmarker, dem bei der AML-Therapie Bedeutung zugesprochen wird, ist CD38, auch cyclic ADP ribose hydrolase genannt. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein, das als Adhäsionspartner für CD31 dient oder als multifunktionales Enzym in den Katabolismus von NAD⁺ (Adenosindiphosphat) und NADP⁺ (2'-Phospho-NAD) involviert ist. Es befindet sich auf der Oberfläche einiger Immunzellen wie B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen und AML Blasten, nicht aber auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen [39, 40]. Durch seine hohe Expression auf Plasmazellen, ist es ein zentrales Target bei der Therapie des Multiplen Myeloms [41]. Aktuell wird der monoklonale Anti-CD38-Antikörper Daratumumab auch in Studien zur Bekämpfung der AML eingesetzt [42, 43]. Auch CD38-CAR-T-Zellen zeigten bereits in präklinischen Studien und im Mausmodell eine effektive Lyse malignen Zellen bei Patienten mit AML oder Multiplem Myelom [44].

CD123: Auch CD123, die α -Kette des Interleukin-3-Rezeptors, wird eine bedeutende Rolle zugesprochen. Es handelt sich um einen Typ I Zytokinrezeptor, der sich auf pluripotenten Vorläuferzellen befindet und in seiner Funktion eine Tyrosinphosphorylierung induziert und somit eine wichtige Rolle bei deren Proliferation und Differenzierung spielt. Es zeigte sich eine Überexpression von CD123 auf leukämischen Stammzellen [45-47], weshalb es ein durchaus interessantes Target darstellt. Auch auf basophilen Granulozyten und dendritischen Zellen kann CD123 gefunden werden. Problematisch gestaltet sich die Interaktion mit gesunden Endothelzellen, wobei IL-3 als Stimulator für endotheliale Proliferation dient [48]. Nachdem sich aber monoklonale Antikörper gegen CD123 im Mausmodell als effizient zur Therapie der AML erwiesen haben [49, 50], befinden sich nun der monoklonale anti-CD123 Antikörper CSL360 in klinischen Studien [51]. Ebenfalls wurden CD123-CAR-T-Zellen entwickelt, bei denen antileukämische Aktivität gegen AML nachwiesen wurde [52-54]. Aktuell befinden sich mehrere Konstrukte mit CD123 und CAR-T-Zellen in Phase I und II Studien [37]. Eine Pilotstudie mit CD123-spezifischen CARs der 4. Generation zur Therapie eines Patienten mit refraktärer AML zeigte eine partielle Revision mit kontrollierbarem Cytokine-Release-Syndrom, jedoch ohne relevante Off-Target-Toxizität [55].

CD32: Des Weiteren wird CD32, ein polymorphes Transmembranglykoprotein, auch FcγRII genannt, betrachtet. Es fungiert als Rezeptor für Immunglobuline und lässt sich auf Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Plättchen und B-Zellen finden. Es mediiert Phagozytose und oxidativen Stress in Granulozyten, ebenso wie Plättchenaggregation und Immunmodulation. Allerdings wird CD32 häufig stark auf leukämischen Stammzellen exprimiert, wodurch es bei der Suche nach neuen Therapien von Interesse ist [56].

CD305: Das Molekül CD305 oder LAIR1 (Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1) ist ein Typ I transmembranäres Glykoprotein, das als inhibitorischer Rezeptor dient. Inhibitorische Rezeptoren regulieren die Immunantwort, um die Lyse von Zellen zu verhindern, die als selbst erkannt werden [57]. CD305 kommt auf fast allen Immunzellen wie natürliche Killerzellen, T-Zellen, B-Zellen und Vorläuferzellen vor [57]. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung der AML spielt. Der LAIR1/SHP-1/CAMK1/CREB-Weg unterstützt das Überleben und die Selbsterneuerung von AML-Stammzellen. Die Hemmung des LAIR1 beeinflusst die normale Hämatopoese nicht, stört jedoch die Leukämieentwicklung und wird somit als Target attraktiv [58].

CD371: CD371, auch CLEC12A (C-type lectin domain family 12 member A) oder CLL-1 (C-type lectin-like molecule-1) genannt, gilt besondere Aufmerksamkeit in der AML Therapie, da es bei vielen AML-Patienten (92 %) überexprimiert ist, jedoch selten auf normalen hämatopoetischen Stammzellen vorkommt [59-61]. Anti-CLEC12A-CAR-T-Zellen konnten in Studien erfolgreich chemotherapieresistente CLEC12A⁺ Zellen erkennen und bieten somit ein Potential zur Eradikation von Vorläuferzellen und Resttumorzellen nach einer Chemotherapie [60]. Aktuell wird an sekundären und tertiären CAR-Modellen geforscht, sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell [62-64]. Es konnte durch die Therapie mit anti-CLL-1-CAR-T-Zellen eine potente antileukämische Aktivität unter Aussparung normaler hämatopoetischer Stammzellen und ein verlängertes Überleben im Mausmodell gezeigt werden [63].

4. Herausforderung der CAR-T-Zell-Therapie

Trotz der Arbeit zahlreicher Forschungsgruppen und der Durchführung einer Vielzahl an Studien erhielten bislang erst zwei CAR-Produkte die Zulassung durch die FDA (Food and Drug Administration). Hierbei handelt es sich um die gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zell-Therapeutika KYMRIAH und YESCARTA zur Therapie der ALL bzw. des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms [65]. Grund für diese begrenzte Anzahl an Zulassungen stellen die bislang ungelöste Probleme der CAR-Therapie dar, wobei die toxischen Nebenwirkungen auf den Organismus im Vordergrund stehen. Hierzu zählen unter anderem das Zytokin-Freisetzungssyndrom, die Neurotoxizität und die On-Target-Off-Tumor-Toxizität.

Das häufigste Problem bei der Zerstörung einer Tumorzelle stellt das Zytokin-Freisetzungssyndrom (engl. Cytokine-Release-Syndrom, CRS) dar [66, 67]. Es manifestiert sich durch teils lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie Schüttelfrost, Fieber, Myalgie, Atemnot, Hautausschläge, Herz- und Leberversagen, Nierenschädigung und disseminierte intravasale Gerinnung [67, 68]. In besonders schweren Fällen wird es auch als Zytokinsturm bezeichnet. Durch massive Aktivierung verschiedener Leukozyten-Populationen, T-Zellen und Zellen des mononukleären Phagozytosesystems zirkulieren große Mengen an pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL-6) und Interferon γ (IFN γ) durch den Kreislauf [23]. Zur Therapie des CRS zeigten sich systemische Corticosteroide als effektiv, wodurch jedoch durch ihre Gabe gleichzeitig der Anti-Tumor-Effekt der CAR-T-Zellen unterdrückt wird [68]. 2017 wurde von der FDA der Interleukin-6-Rezeptorblocker Tocilizumab zur Therapie des schweren CRS zugelassen [68, 69]. Auch der TNF α -Inhibitor Etanercept zeigte sich in verschiedenen Studien zur Therapie des CRS als wirksam [53, 70].

Als weitere unerwünschte Wirkung der CAR-T-Zell-Therapie wird eine Neurotoxizität beobachtet [71, 72]. Symptome wie visuelle Halluzinationen, Delir, Dysphasie, Myoklonien und Epilepsie können hierbei auftreten. Bislang zeigten sich die Symptome als reversibel [71, 72]. Die genaue Ursache ist

derzeit noch unbekannt. Tiermodelle und klinische Studien legen nahe, dass Monozyten, eine endotheliale Dysfunktionen und die Blut-Hirn-Schranke bei der Entwicklung der CAR-T-Zell-assoziierten Neurotoxizität eine zentrale Rolle spielen [72]. Da der Pathomechanismus nicht genau geklärt ist, erweist sich die Therapie als erschwert. Dieses Problem könnte durch die Etablierung eines sicheren und kontrollierbaren CAR-Systems umgangen werden.

Besonderes Augenmerk wird in der vorliegenden Arbeit auf die On-Target-Off-Tumor-Toxizität gelegt. Ein ideales Target-Antigen zur Tumortherapie wäre ein Marker, der ausschließlich auf malignen Zellen, nicht aber auf gesundem menschlichem Gewebe exprimiert ist und sozusagen ein exklusives Targeting ermöglicht. Ein solches leukämiespezifisches Molekül konnte bislang für die AML nicht identifiziert werden, weshalb die CAR-T-Zellen nicht nur die entarteten Tumorzellen, sondern auch gesundes Gewebe angreifen und zerstören. Hierbei können abhängig vom verwendeten Antigen und dessen Expression auf den unterschiedlichen Zelloberflächen des Körpers alle Organsysteme betroffen sein. Die Probleme können somit je nach betroffenen Strukturen variieren. Beispielsweise wird bei der ALL-Therapie mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen eine B-Zell-Aplasie hervorgerufen [73]. Die therapiebedingten Nebenwirkungen können je nach Zielstruktur der Therapie bis hin zum Tode führen. Dies wurde unter anderem bei einem Patienten beobachtet, der unter Therapie mit HER-2/neu-spezifischen CAR-T-Zellen einer respiratorischer Insuffizienz erlag und an Multiorganversagen verstarb [74]. Die AML-Therapie wird durch die On-Target-Off-Tumor-Toxizität vor ein großes Hindernis gestellt, da die typischen, von den Tumorzellen exprimierten Oberflächenmoleküle, in hohem Maße ebenfalls auf gesundem Gewebe exprimiert werden. So findet man beispielsweise das CD123-Target nicht nur auf leukämischen Stammzellen, sondern auch auf Endothelzellen, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommen [48].

Diese und noch weitere Nebenwirkungen der CAR-Therapie werden besonders durch die fehlende Steuerbarkeit des Systems ausgelöst. Sind die CAR-T-Zellen im Organismus, können sie unkontrolliert Gewebe angreifen und CRS, Neurotoxizität und weitere lebensbedrohliche Situationen schaffen.

Ein wichtiger prognostischer Faktor in Bezug auf die AML stellt die Minimal Residual Disease (MRD) dar, welche die kleinste Anzahl an leukämischen Zellen beschreibt, die nach der Therapie verblieben sind. Diese Population besteht meist aus leukämischen Stammzellen, die sich der Chemotherapie entziehen und den Hauptgrund für ein Krankheitsrezidiv darstellen [75, 76]. Dies stellt die CAR-T-Therapie vor eine neue Herausforderung, die Umgehung einer sogenannten Immunevasion (engl. Immune Escape) [77, 78]. Dabei machen sich die Leukämiezellen verschiedene Mechanismen zu Nutze. Durch die Hochregulierung anti-apoptotischer Proteine, die Herunterregulierung der Antigenexpression und durch Veränderungen der T-Zellpopulationen können die Tumorzellen eine Therapieresistenz entwickeln [79]. Insbesondere monovalente CARs haben einen strengen Selektionsdruck auf den Tumor, was zu einer Antigenevasion führen kann. Dieses Phänomen stellt einen der Hauptgründe für das Therapieversagen dar [80, 81]. Besonders bei Tumoren mit einer heterogenen Antigenexpression besteht die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens durch eine Einzeltherapie mit nur einem Antigen [82]. Es wird folglich an CAR-Systemen geforscht, die auf unterschiedliche Antigene gleichzeitig abzielen, um so der Evasion geschickt zu entgehen. Einen ersten Lösungsansatz hierfür stellen beispielsweise bispezifische Antikörper oder CAR-T-Zellen dar [76, 83]. Bispezifische Antikörper bieten großes Potential, sind jedoch durch den Einfluss der Halbwertszeit auf die Verabreichung und die Abhängigkeit vom Immunsystem des Patienten begrenzt [84]. CAR-T-Zellen bieten sowohl die Spezifität von Antikörpern als auch eine verbesserte Effektor-Funktion [85].

Bei Betrachtung der zuvor geschilderten Probleme und noch zu bewältigenden Herausforderungen liegt der Wunsch nach einem sicheren und wirksamen CAR-System nahe. Ein solches „optimales“ CAR-System sollte zusammenfassend folgende Kriterien erfüllen: Es sollte kontrollierbar sein, ein flexibles Targeting zulassen und selektiv zwischen Tumorzelle und gesunder Zelle unterscheiden können.

5. [Adapter CAR-T-Zellen \(AdCAR-T-Zellen\)](#)

In der Geschichte des CAR-Designs wurden viele weitere Varianten und Subtypen der gängigen vier CAR-Generationen kreiert (Vgl. Abbildung 2, S 7). Hierbei haben verschiedene Arbeitsgruppen Systeme entwickelt, die auf der Zwischenschaltung eines Adaptermoleküls (AMs) basieren. Diese AMs können unterschiedlich konstruiert sein. Bislang wurden Marker wie Biotin, Avidin und FITC (Fluoresceinisothiocyanat) genauer untersucht [86-88].

Eines dieser neuen Designs, welches in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, stellen die AdapterCAR-T-Zellen (AdCAR-T-Zellen) dar. Das AM der AdCARs enthält ein von dem endogenen Vitamin Biotin abgeleitetes Epitop, ein so genanntes Linker-Label-Epitop (LLE), welches durch die Anti-LLE-scFv-Domäne des AdCARs erkannt wird. Das LLE ist dem körpereigenen Biotin zwar strukturell sehr ähnlich, jedoch konnten keine Wechselwirkungen mit physiologischem Biotin im menschlichen Körper gefunden werden [89]. LLEs können leicht auf Adaptermoleküle wie monoklonale Antikörper (engl. monoclonal antibodies, mAbs) oder mAb-Fragmente konjugiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten, mit Biotin besetzten Antikörper, werden daher als bmAb (biotinylated monoclonal Antibody) bezeichnet. Die AMs bestehen aus einer CAR-Bindungsdomäne und einer Antigenbindungsdomäne zur Erkennung der Targetantigene. In Abbildung 3 ist der schematische Aufbau eines konventionellen CARs im Vergleich zu einem Adapter-CAR dargestellt.

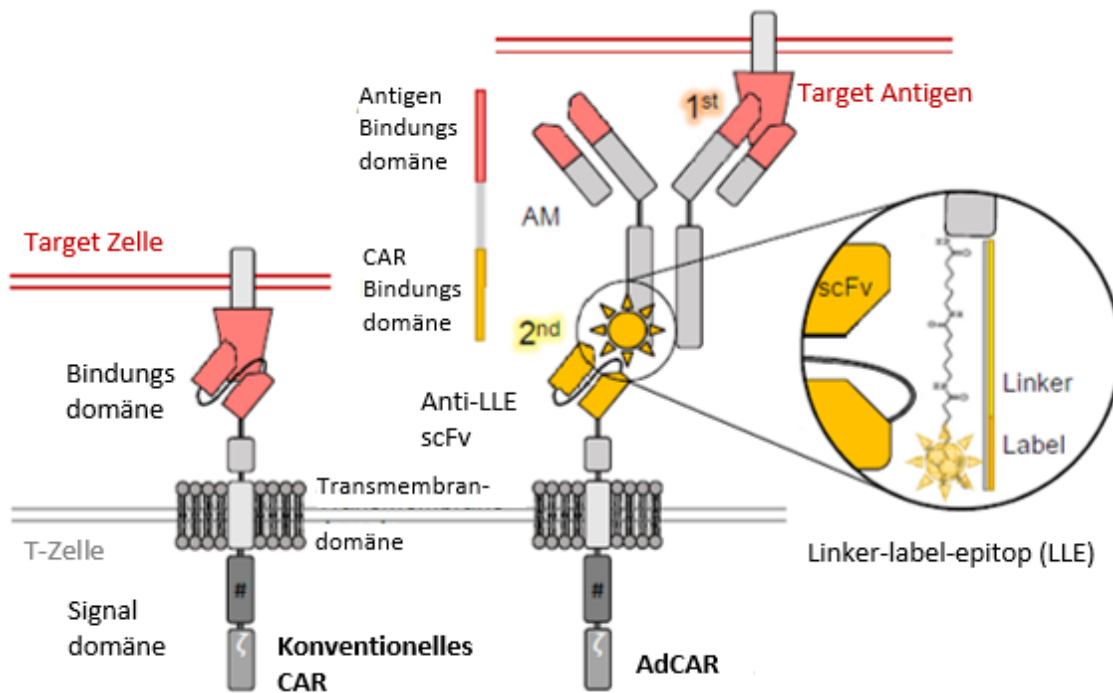


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines konventionellen CARs und eines Adapter-CARs

Ein konventionelles CAR (links) besteht aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne, einer intrazellulären costimulatorischen Domäne und einer Signaldomäne. Ein Adapter CAR (rechts) ist ebenfalls aus einer Signaldomäne, einer Transmembrandomäne und Bindungsdomäne aufgebaut. Es besitzt jedoch eine spezielle Anti-LLE-scFv-Bindungsdomäne. Diese Domäne erkennt das Adaptermolekül an seinem Linker-Label-Epitop, einem Biotin-Derivat. Die Antigenbindungsdomäne des AdCARs bindet die Targetantigene auf der Tumorzelle.

(Grafik adaptiert aus dem Manuskript Seitz ...Kieble... et al. - Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting, in Revision bei Cancer Immunology Research)

Das Adaptermolekül der AdCARs basiert auf den Charakteristika des monoklonalen Antikörpers mBio3. mBio3 bindet an Biotin als spezifischer Linker. Zum Design der AdCAR-T-Zellen wurde der scFv des mBio3 auf CARs der zweiten Generation konjugiert. Ein gekürztes LNGFR (Low-affinity nerve growth factor receptor) wurde nach einer FA2-Stelle (ribosomal skip) co-exprimiert, um ohne Absättigung des AdCARs eine Detektion und Kontrolle der Anreicherung zu ermöglichen. Die genaue Bezeichnung der in dieser Arbeit genutzten AdCAR-T-Zellen ist AdCAR-4-1BB-CD3-zeta, IgG hinge.

Die AdCAR-T-Zell-Aktivierung erfolgt in zwei Schritten: Zunächst findet eine antigenspezifische Bindung des Adaptermoleküls an die Targetzelle und im nächsten Schritt eine Bindung der AdCAR-T-Zelle an das Adaptermolekül statt. Durch die Bindung von Zielzelle, AM und AdCAR-T-Zelle wird eine Signalkaskade aktiviert, die durch konsekutive Zytokinsekretion und Freisetzung lytischer Granula mit Perforin und Granzym eine Lyse der Tumorzelle induziert.

Konventionelle CARs können nur ein On-Signal (Anwesenheit von Antigenen) oder ein Off-Signal (Abwesenheit von Antigenen) erkennen. Das Besondere am AdCAR-System ist die Trennung von Antigenerkennung und CAR-Aktivierung durch Zwischenschaltung von Adaptermolekülen. AdCAR-T-Zellen können nur in Anwesenheit spezifischer AMs aktiviert werden, die zwischen AdCAR und Zielzelle vermitteln. Somit wird eine präzise qualitative Regulationsmöglichkeit geschaffen, da sich das System quasi ein- und ausschalten lässt. Die Terminierung der CAR-Aktivität erfolgt beispielsweise durch Gabe antigenspezifischer Antikörper ohne LLE-Label [89]. Ebenso ist eine quantitative Regulation möglich, indem sich die Auswahl der Zielantigene, deren Konzentration und Kombination verändern und optimieren lassen [89]. Es konnte gezeigt werden, dass AdCAR-T-Zellen das gleichzeitige Targeting verschiedener Antigene auf einer Tumorzelle ermöglichen [89]. In Abbildung 4 (S 17) ist das synchrone Targeting mehrerer Antigene auf einer Tumorzelle schematisch dargestellt.

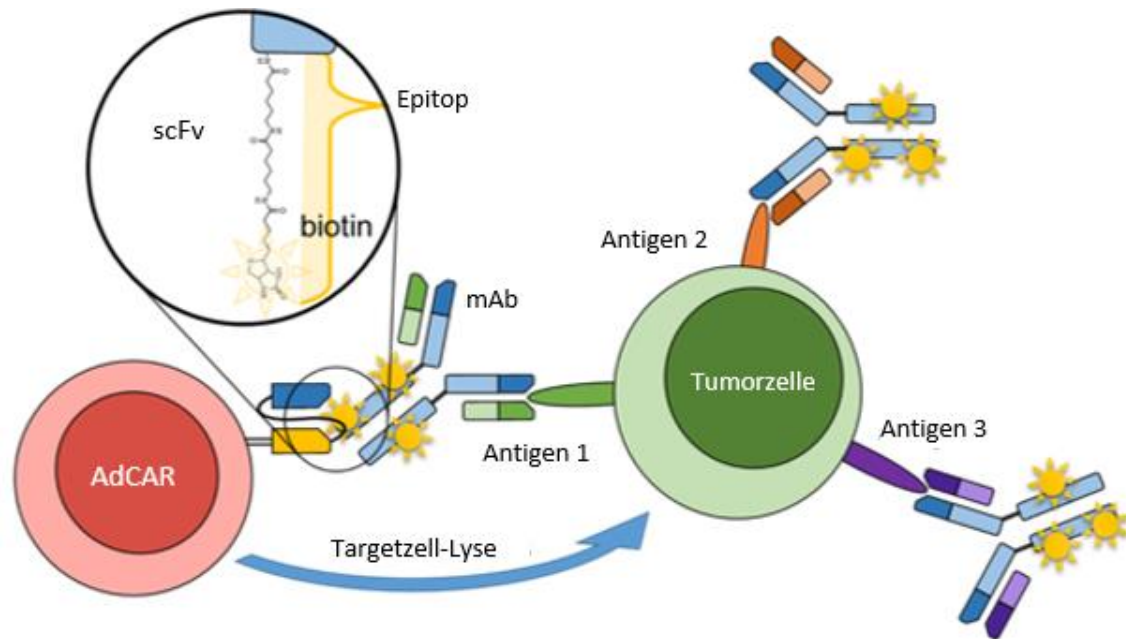


Abbildung 4: Tumorlyse durch ein Adapter-CAR (AdCAR) durch synchrones Targeting mehrerer Antigene

Das AdapterCAR (AdCAR) bindet über ein Adaptermolekül (Linker-Label-Epitop, LLE) das Antigen auf der Tumorzelle. Synchron werden Antigen 2 und 3 bereits von LLEs besetzt, damit weitere AdCARs gleichzeitig die Tumorzelle binden können.

(Grafik adaptiert aus dem Manuskript Seitz ...Kieble... et al. - Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting, in Revision bei Cancer Immunology Research)

Das Adapter-CAR-System bietet folglich großes Potenzial durch die Möglichkeit der Kontrolle durch das An- und Abschalten des Systems, es bietet Flexibilität, da es multiples synchrones und sequenzielles Targeting erlaubt und es bietet eine gewisse Selektivität, um zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe zu unterscheiden [89]. Aufgrund dieser Vorteile und Möglichkeiten wurde dieses CAR-System für die nachfolgenden Versuche verwendet.

6. [Surface-Activation-Matrix \(SAM\)](#)

Eine verlässliche Zytolyse durch CAR-T-Zellen kann entweder durch eine ausreichende Antikörpermenge erzielt werden (S 19, Abbildung 5 links) oder auch durch die Kombination verschiedener Antikörper, die auf einer Zelle exprimiert sind und zeitgleich gebunden werden (S 19, Abbildung 5 rechts).

Das im Folgenden veranschaulichte Prinzip, auch als Oberflächen-Aktivierungsmatrix (engl. Surface-Activation-Matrix, SAM) bezeichnet, könnte durch Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie der AML bewirken. Grundgedanke dahinter ist die Kombination mehrerer Antikörper in subtherapeutischer Dosierung, wodurch diese gemeinsam einen spezifischen therapeutischen Effekt bewirken sollen, das heißt, dass mit einem einzelnen Antikörper in subtherapeutischer Dosierung keine spezifische Lyse, jedoch in der Kombination mehrerer Antikörper in subtherapeutischer Dosierung eine relevante Tumorlyse induziert werden kann.

Das Schaubild 5 (S 19) zeigt das Prinzip der SAM. Links ist die Tumorlyse durch AdCAR-T-Zellen mit einem hochdosierten monovalenten Antikörper dargestellt. Auf der rechten Seite ist das synchrone Targeting dreier verschiedener Antikörper (A, B und C) auf einer Tumorzelle und die dadurch erzeugte Lyse zu erkennen.

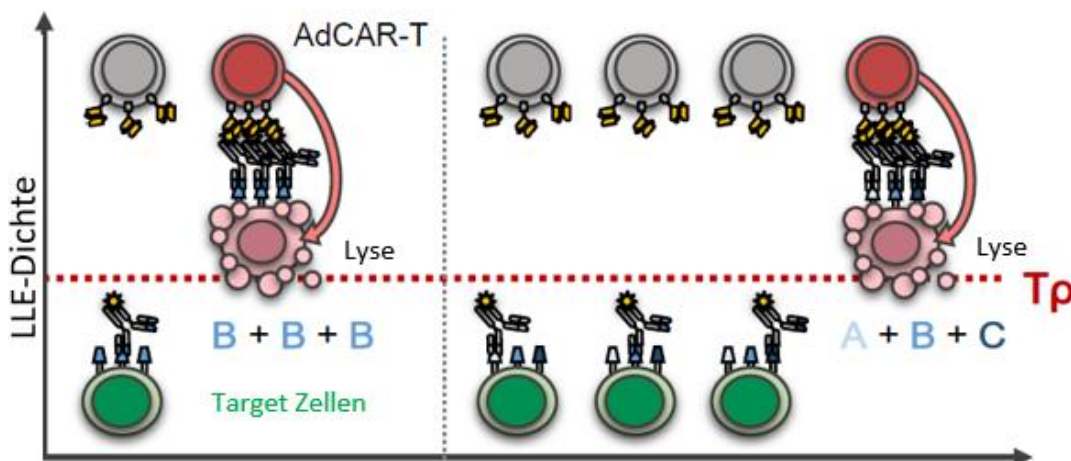


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Target-Zell-Identifizierung und Lyse durch Integration von Expressionsprofilen

Links ist die Lyse einer Targetzelle (Tumorzelle, grün) durch AdapterCAR-T-Zellen (rot) mit einem hochdosierten monovalenten Antikörper B dargestellt. Die rechte Seite zeigt im Vergleich dazu die Lyse durch synchrones Targeting dreier verschiedener Antikörper A, B und C auf einer Tumorzelle. Sobald eine bestimmte LLE-Dichte (Linker-Label-Epitop) erreicht ist, kann eine Lyse induziert werden.

(Grafik adaptiert aus dem Manuskript Seitz ...Kieble... et al. - Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting, in Revision bei Cancer Immunology Research)

Aufgrund der Heterogenität der AML und der Variabilität der Oberflächenmoleküle ist ein synchrones multiples Targeting erforderlich, um die Gesamtheit der AML-Blasten zu erreichen und dadurch Resistenzen durch Antigenverlust vorzubeugen [30]. Durch geschickte Kombination von Antikörpern, die auf den AML-Zellen hoch exprimiert sind, und gleichzeitiger Verwendung subtherapeutischer Dosen soll es möglich sein, die zytolytische Aktivität von AdCAR-T-Zellen auf den Tumor zu fokussieren und gesundes Gewebe relativ auszusparen.

7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es, das Prinzip der zuvor beschriebenen SAM bei den drei Leukämiezelllinien HL-60, U-937 und MOLM-13 genauer zu untersuchen und nachzuweisen.

Hierzu wurden zunächst die Tumorzelllinien in Bezug auf ihr Fluoreszenzlevel und ihre Antigenexpression via Durchflusszytometrie analysiert.

Zur Herstellung der AdCAR-T-Zellen wurden PBMCs verschiedener gesunder Spender isoliert, transduziert und angezchtet. Es folgte eine Qualitätskontrolle der AdCAR-Expression via Durchflusszytometrie.

In Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assays wurde durch Antikörpertitrations das Prinzip der SAM untersucht. Es erfolgte die Titration der verschiedenen Adaptermoleküle im AdCAR-System bei den drei AML-Zelllinien. Als AMs wurden die biotinylierten Antikörper bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305 und bCD371 verwendet. Es wurde die subtherapeutische Dosierung eruiert, bei der keine spezifische Tumorlyse mehr stattfand, um die Theorie zu überprüfen, ob durch die Kombination von fünf Antikörpern in subtherapeutischer Dosierung wiederum eine überzeugende Lyse induziert werden kann.

II. Material und Methoden

1. Zellkultur

1.1. Zelllinien

Bei der Zelllinie HL-60 handelt es sich um Promyeloblasten aus einer menschlichen akuten promyeloischen Leukämie (AML FAB M2, DSMZ Nummer ACC 3). Sie stammt von einer 36 Jahre alten kaukasischen Frau aus dem Jahr 1976. Die Verdopplungszeit der runden, einzelnen Suspensionszellen liegt bei 40 Stunden. Gepflegt wurden sie auf eine Dichte von $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml.

Die U-937-Zellen sind ebenfalls einzelne Suspensionszellen, die rund bis polygonal erscheinen. Die Monozyten stammen aus dem Pleuraerguss eines 37 Jahre alten kaukasischen Mannes mit histiozytärem Lymphom aus dem Jahr 1974, DSMZ Nummer ACC 5. Die Zelllinie wurde durch Transfektion der U-937-Zellen mit einem pcDNA-DC-SIGN Plasmid entwickelt. Die Verdopplungszeit der Zelllinie liegt bei 30-40 Stunden. Gepflegt wurden sie auf eine Dichte von $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml.

Die Zellen der Linie MOLM-13 sind akute Leukämiezellen (AML FAB M5a, DSMZ Nummer ACC 554). Isoliert wurden sie im Jahr 1995 aus dem peripheren Blut einer 20 Jahre alten Frau mit Rezidiv einer AML nach initialem myelodysplastischem Syndrom. Ihre Verdopplungszeit liegt bei 50 Stunden. Gepflegt wurden die runden Suspensionszellen auf $0,4-2,0 \times 10^6$ Zellen pro ml.

1.2. Zellpflege

Die verschiedenen Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren Suspensionszellen. Sie wurden je nach Volumen in Zellkulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² kultiviert. Im Brutschrank wurden sie bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % aufbewahrt.

Gepflegt wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage. Zunächst wurde die Zellkulturflasche betrachtet, in der das Medium mit der Zeit von rot nach gelb umschlug, was auf eine pH-Änderung in den sauren Bereich hinwies. Danach wurden die Zelldichte und Zellform unter einem Inversionsmikroskop beurteilt. Anschließend wurde je 0,5 ml der Kultur in je ein Eppendorf Tube gefüllt, um ihre Dichte mit Hilfe des ABX Micros CRP 200 zu bestimmen. Gepflegt wurden die Zellen auf eine Dichte von 0,5 Millionen pro ml. Hierzu wurde die gewünschte Anzahl an Tumorzellen behalten und mit einem RPMI Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgefüllt.

Um die AdCAR-T-Zellen zu pflegen, wurden ebenfalls 0,5 ml der Zellkulturflasche in ein Eppendorf Tube gefüllt. Mit Hilfe des ADVIA 120 wurde die Zelldichte und mit dem ABL 800 wurde der Lactat-Wert gemessen. Eingestellt wurden die Zellen solange auf 0,8 Millionen pro ml, bis die Dichte beim Messen unter 2 Millionen pro ml lag. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie auf 1 Millionen pro ml gepflegt. Als Medium diente hierbei TexMACS mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % IL-7 und 0,05 % IL-15.

1.3. Einfrieren (Kryokonservierung) und Auftauen

Einfrieren (Kryokonservierung)

Um die Zellen, sowohl AdCAR-T-Zellen als auch Tumorzellen, optimal zu konservieren, wurden sie eingefroren. Hierzu wurden zunächst die einzufrierenden Zellen gezählt, damit die Menge an Einfriermedium berechnet werden konnte. Pro Kryo-Tube wurden maximal 100 Millionen AdCAR-T-Zellen oder 30 Millionen Tumorzellen auf je 1,5 ml Einfriermedium eingefroren. Das Einfriermedium bestand zu 90 % aus FCS und zu 10 % aus DMSO.

Die einzufrierende Zellmenge wurde zunächst in einem Falcon 10 Minuten bei 20 °C, 250 g, R9/9 bei Tumorzellen bzw. R9/7 bei AdCAR-T-Zellen zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Zellpellet schnell im Einfriermedium resuspendiert und auf die Kryo-Tubes verteilt. Der zuvor bei -20 °C kalt gestellte Mr. Frosty wurde nun genutzt, um diese in den -80 °C kalten Gefrierschrank zu bringen. Hier wurden sie maximal ein halbes Jahr gelagert und dann in einem Stickstofftank konserviert.

Auftauen

Damit die Zellen nach dem Auftauen optimale Bedingungen hatten, wurde zunächst ein 15 ml oder 50 ml Falcon mit warmem Medium bereitgestellt. Um die Kryo-Tubes aufzutauen, wurden sie vorsichtig in das Wasserbad von 37 °C gehalten bis sich nahezu alles aufgelöst hatte. Anschließend wurden die Zellen in das mit Medium vorbereitete Falcon pipettiert. Danach wurden sie 5 Minuten bei 20 °C, 300 g, R9/9 bei Tumorzellen bzw. R9/7 bei AdCAR-T-Zellen zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands konnten die Zellen nun in neuem warmem Medium resuspendiert und auf die gewünschte Dichte gepflegt werden. Tumorzellen wurden auf eine Konzentration von 1 Millionen pro ml und AdCAR-T-Zellen auf 2 Millionen pro ml eingestellt.

2. Herstellung von AdCAR-T-Zellen

Übersicht

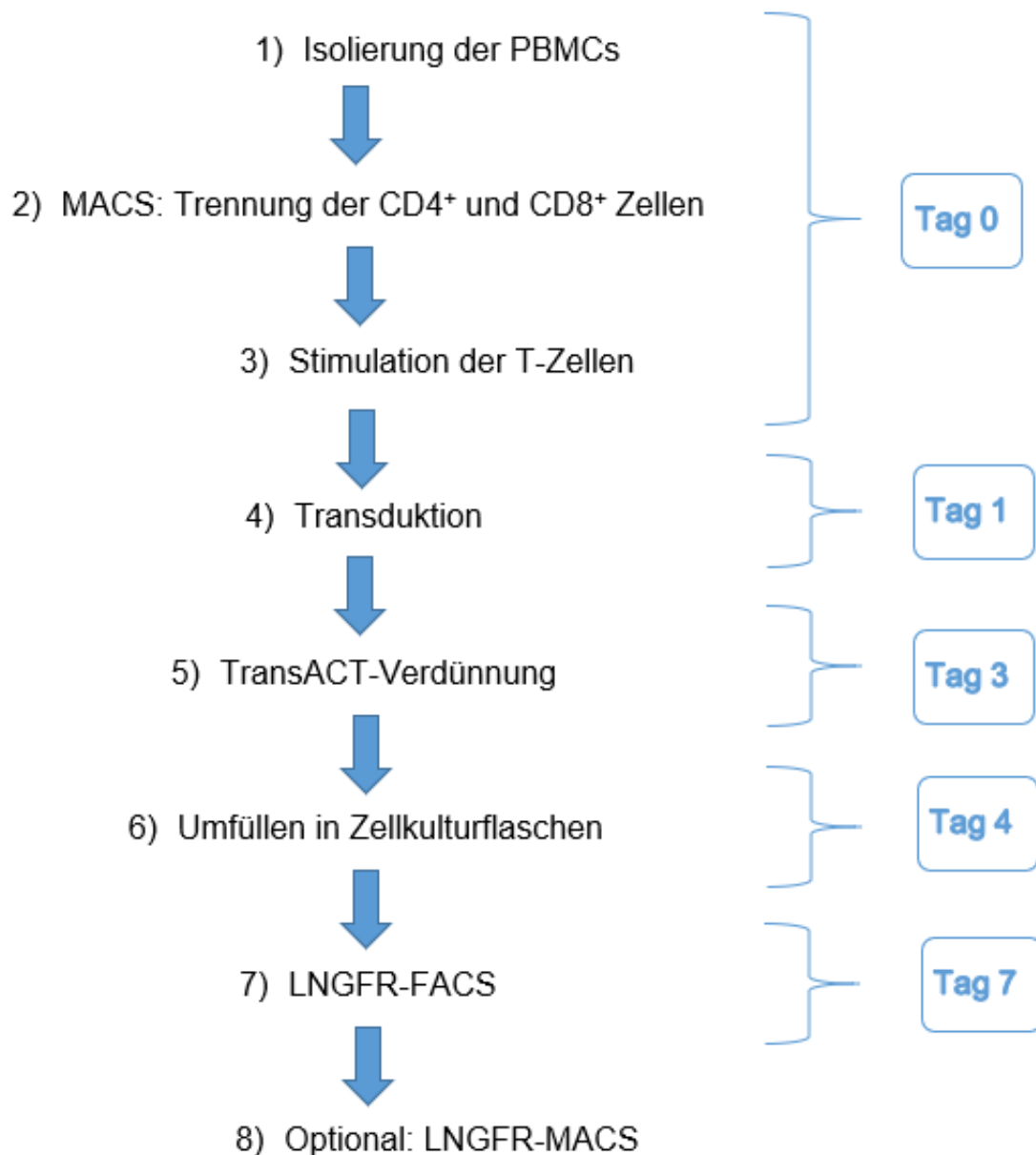


Abbildung 6: Herstellung von AdCAR-T-Zellen

Übersicht über die Schritte zur Herstellung der AdCAR-T-Zellen. Zunächst werden PBMCs isoliert, die CD4- und CD8- positiven Zellen durch MACS-Technik getrennt, die T-Zellen stimuliert und schließlich transduziert. Nach der TransACT-Verdünnung folgt die Umfüllung in Zellkulturflaschen. An Tag 7 findet das LNGFR-FC statt. Optional können die AdCAR-T-Zellen noch durch LNGFR-MACS angereichert werden.

2.1. Ficoll: Isolierung der PBMCs

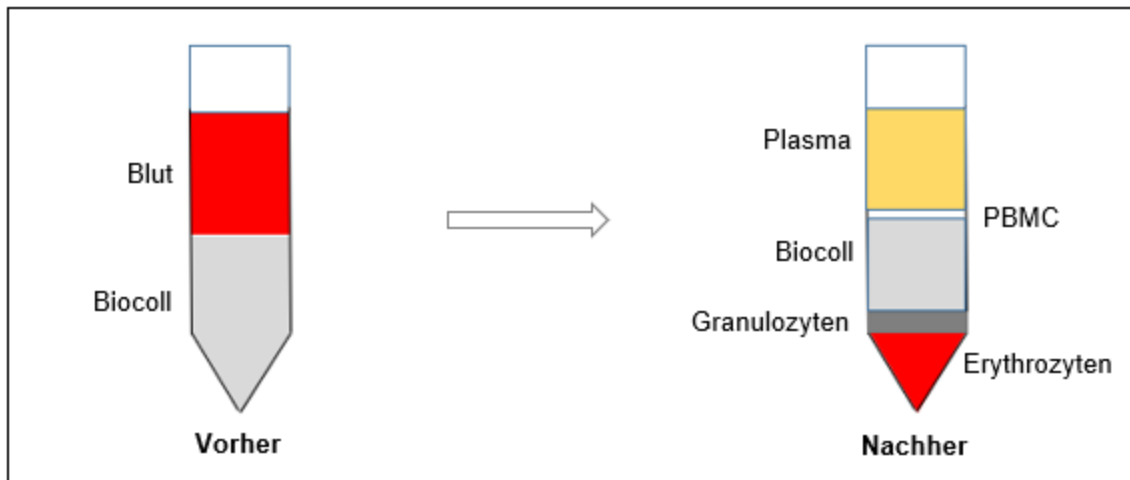


Abbildung 7: Isolierung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation

Links ist die Schichtung im Falcon vor der Dichtegradientenzentrifugation dargestellt, wobei das Blut auf den Biocoll geschichtet ist. Das rechte Bild zeigt die Schichtung nach der Zentrifugation. Von oben nach unten werden Plasma, PBMCs, Biocoll, Granulozyten und Erythrozyten separiert.

Zur Isolierung der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurde von einem gesunden Spender Vollblut in eine mit Heparin benetzte Spritze abgenommen. Pro 10 ml Blut wurde 0,1 ml Heparin verwendet. Das Blut wurde dann im Verhältnis 1:1 mit PBS (Phosphate Buffered Sialine) in einer Zellkulturflasche vorsichtig gemischt. In 50 ml Falcons wurden je 20 ml Biocoll vorbereitet. Biocoll ist ein isotonisches Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml, das unter dem Markennamen Ficoll zur Dichtegradientenzentrifugation dient. Die Blut-PBS-Mischung wurde nun vorsichtig mittels einer 25 ml-Stripette langsam darüber geschichtet, ohne die 2 Phasen zu vermischen. In der Zentrifuge (20 °C, 1/R1), RCF 800 g, 30 min) wurden die Bestandteile nach ihrer Dichte geordnet (Vgl. Abb. 7). Unterhalb des Biocoll lagerten sich die schwereren Zellen, Erythrozyten und Granulozyten. Oberhalb befanden sich die Zellen mit geringerer Dichte, die Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten. Dabei bildeten die Monozyten gemeinsam mit den Lymphozyten direkt oberhalb des Biocoll einen PBMC-Ring. Der dünne weißliche PBMC-Ring wurde nun mit einer 25 ml Stripette abgezogen und in ein neues 50 ml Falcon gegeben. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und gewaschen (20 °C, 9/R9, 500 g, 10 min). Nach Entfernung des Überstands folgte der zweite

Waschgang mit PBS (20 °C, 9/R9, 400 g, 10 min). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pallet mit einer 1000 µl- Stripette vorsichtig resuspendiert und in 10 ml PBS pro 100 ml Vollblut aufgenommen. Davon wurden 0,5 ml in ein Eppendorf-Cup geben, um die Zellzahl mit dem ADVIA 120 zu bestimmen. Der Rest wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt.

2.2. MACS: Trennung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Als MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) wird ein immunomagnetisches Verfahren zur Zellseparation bezeichnet. Hierbei werden die Zellen mit Magnet-Antikörper-Partikeln, den sogenannten MicroBeads, inkubiert und gelabelt. Durchfließt das Zellgemisch die von einem Magnetfeld umgebene MACS-Säule, bleiben die markierten Zellen in der Säule hängen. Alle anderen ungelabelten Zellen durchfließen die Säule, ohne zu adhären. Wenn man nun diese markierten Zellen separieren möchte, spült man die Zellen aus der Säule aus (Positive Selektion). Möchte man stattdessen die restlichen Zellen ohne Markierung, dann wird der Vorgang Deletion genannt. Die Magnet-Antikörper-Partikel besitzen eine Polysaccharidhülle, an die der Antikörper gebunden ist. Sie zersetzt sich nach einigen Tagen und die Partikel können sich von den Zellen lösen [90]. Die Schritte der positiven Selektion der CD4⁺-Zellen mit der MACS-Technik sind in Abbildung 8 [91] schematisch dargestellt.

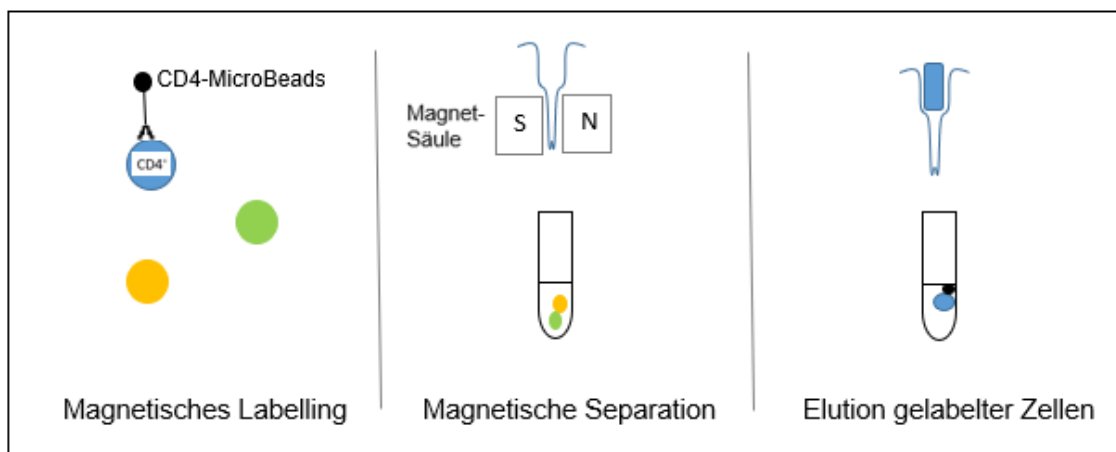


Abbildung 8: Positive Selektion CD4⁺-Zellen durch MACS-Technik

Das Schema zeigt die Separation der CD4-positiven von den CD4-negativen Zellen. Im Ersten Schritt werden die Zellen mit CD4-MicroBeads gelabelt, anschließend in eine Magnetsäule überführt, in der die gelabelten Zellen zurückbleiben. Im Letzten Schritt werden die gesuchten CD4 positiven Zellen aus der Säule ausgewaschen. *(In Anlehnung an Miltenyi Biotec)*

Durchführung

Die Durchführung lehnt sich an das Datenblatt von Miltenyi Biotec GmbH für CD4- und CD8-MicroBeads [90].

Das im letzten Schritt vorbereitete 50 ml-Falcon wurde nun 10 Minuten zentrifugiert bei 4 °C, 250 g, R9/7. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in MACS-Puffer (MP) resuspendiert, und zwar in 80 µl pro 10⁷ Zellen. Hierzu wurden dann 20 µl pro 10⁷ Zellen CD8-MicroBeads gegeben und das Gemisch wurde 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit 1,5 ml pro 10⁷ Zellen MP gewaschen (4 °C, 250 g, R9/7). Der Überstand wurde wieder entfernt und die Zellen in 1 ml MP resuspendiert.

Die Magnetsäule (LS-Column) wurde in den QuadroMACS-Separator eingespannt. Pro Säule können etwa 100 Millionen Zellen separiert werden. Vorgespült wurde jede Säule mit 3 ml MP. Nun wurden die Zellen hinzugegeben und die Säule dreimal mit 3 ml MP gespült. Dabei sollte die Säule niemals komplett leerlaufen. War das Volumen fast vollständig durchgelaufen, wurden nochmals 5 ml MP zugegeben. Die in der Säule verbliebenen markierten Zellen wurden sofort mit Hilfe des Stempels außerhalb des Magnetfeldes in ein 50 ml Falcon gedrückt. Anschließend wurden diese CD8-positiven Zellen dreimal mit gekühltem RPMI ohne Zusätze bei 4 °C, 250 g, 9/R7 gewaschen. Hierbei wurde nach der 2. Waschung das Pallet in circa 10 ml RPMI aufgenommen und die Zellzahl mittels dem ADVIA 120 bestimmt.

Der Zellrest, der unterhalb der Säule in einem 50 ml-Falcon aufgefangen wurde, wurde auf genau dieselbe Weise mit CD4-MicroBeads selektiert.

Nach der dritten Waschung mit RPMI konnten die Zellen nun in entsprechend viel CAR-T-Zell-Medium aufgenommen werden, um eine Konzentration von 1 Millionen pro ml zu erhalten.

2.3. Stimulation der T-Zellen

Auf einer 24-Well-Platte wurden nun jeweils 1 ml der CD4⁺ Zellen und 1 ml der CD8⁺ Zellen in ein Well pipettiert, sodass sie im Verhältnis 1:1 zueinanderstehen. Die Anzahl der Wells richtete sich nach der Ausbeute und dem Bedarf an AdCAR-T-Zellen, in der Regel 3 bis 4 Wells. Nach Vorgaben von Miltenyi Biotec GmbH wurde jedes Well mit 20µl TransAct stimuliert.

2.4. Transduktion (Tag 1)

Mit einer Pipette wurde zunächst 1 ml Medium vom oberen Rand jedes Wells abgenommen, ohne die Zellen am Boden mit zu entfernen. Dann wurde das Viruskonstrukt No4 lipo auf die Zellen gegeben (zwischen 10-25 µl je nach Qualität des Virus). Ein Well wurde dabei nicht transduziert, es diente als Kontrolle und wurde als „MOCK“ bezeichnet. Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 30 Minuten bei 32 °C, 800 g, R9/0 zentrifugiert.

2.5. TransACT-Verdünnung (Tag 3)

Um an Tag 3 das TransACT zu verdünnen, wurde mit einer Pipette 0,5 ml am oberen Rand aus jedem Well entnommen und mit 2 ml frischem AdCAR-T-Zell-Medium aufgefüllt.

2.6. Umfüllen in Zellkulturflaschen (Tag 4)

Zunächst wurde von dem alten Medium 1 ml pro Well mit einer Pipette entfernt. Im übrigen Volumen wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und schließlich in eine Zellkulturflasche überführt (AdCARs in eine T75 Flasche, MOCK in eine T25 Flasche). Mit neuem CAR-T-Zell-Medium wurden die Wells nochmals ausgespült und letzten Endes das Volumen verdreifacht. Aus einem Well mit 2,5 ml Anfangsvolumen wurden also 7,5ml Medium.

2.7. LNGFR-FC

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FC, Flow cytometry) können physikalische und molekulare Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom analysiert werden. Das Prinzip beruht auf der Messung optischer Signale der Zellen, die einen Laserstrahl passieren und einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörpern hervorgerufen wird. Die Zellen werden im FC-Gerät aufgrund hydrodynamischer Fokussierung einzeln wie an eine Perlenkette gereiht an einem gebündelten Laserstrahl mit entsprechender Wellenlänge vorbeigeleitet. Wenn die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes nun angeregt werden, werden sie auf ein höheres Energieniveau gehoben. Ist der Impuls beendet, fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, wobei sie Energie in Form von Photonen ausstrahlen. Diese Photonenkonzentration, die sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper verhält, kann nun mittels eines Detektors gemessen werden. Dadurch ist eine quantitative Analyse der Antigenexpression auf den Zellen möglich [92, 93].

Je nach Form, Struktur und Färbung der Zellen werden unterschiedliche Effekte sichtbar. So können durch Lichtbeugung und Streuung Informationen über Zellgröße, Granularität und Zellkerngröße gewonnen werden. Mit dem Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter, FSC) kann Rückschluss auf die Zellgröße, mit dem Seitwärtsstreulicht (engl. sideward light scatter, SSC) auf die Zellgranulierung gezogen werden. Granulozyten streuen aufgrund ihrer rauen Oberfläche und ihrer Vesikel deutlich mehr Licht als glatte T-Zellen [92, 93].

Es ist möglich, Messungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchzuführen, da die jeweiligen Farbstoffe verschiedene charakteristische Emissionsspektren besitzen. Als Kontrolle wird immer eine ungefärbte Probe benötigt, da die Zellen an sich bereits eine unspezifische Autofluoreszenz besitzen.

Durchführung LNGFR-FC

Um die Expression der AdCAR-T-Zellen zu bestimmen, wurde eine FC-Analyse mit dem Antigen LNGFR durchgeführt. Es wurden drei FC-Tubes vorbereitet, eines für ungefärbte „MOCK“ (unstained), eines für gefärbte MOCK (stained) und eines für gefärbte AdCARs. Hierzu wurden je 200.000 Zellen in jedes Tube gefüllt und mit 2 ml MP in der Zentrifuge gewaschen (4 °C, 250 g, R9/7, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Tubes auf einem Papiertuch abgetupft und schließlich die Antikörper hinzugegeben: 5 µl anti-LNGFR FITC, 5 µl anti-CD8 APC Vio770 und 3 µl anti-CD4 BUV 395 pro Tube. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde jedes Tube wieder mit 2 ml MP gewaschen (4 °C, 250 g, R9/7, 5 min), der Überstand abgekippt und nur wenige Tropfen MP zugegeben. Um die Antikörper vor übermäßiger Lichteinstrahlung zu schützen, wurden die Tubes in Alufolie verpackt zum LSR-Gerät transportiert. Hier erfolgte nun die Analyse.

Die Spannung der FSC und SSC wurde so eingestellt, dass die gesamte Zellpopulation sichtbar war. Mit Hilfe der in Abbildung 9 aufgeführten Gating-Strategie konnte nun die LNGFR-Expression der AdCAR-T-Zellen bestimmt werden.

Hierzu wurde zunächst mit Hilfe der Parameter FSC-A und SSC-A die lebendige Zellpopulation separiert. Im nächsten Schritt konnten durch die Parameter FSC-H und FSC-A die Einzelzellen von aneinanderhaftenden Dupletten differenziert werden. Um die LNGFR-Expression dieser Population zu bestimmen, wurde LNGFR-FITC gegen SSC-A aufgetragen, um die AdCAR-T-Zellen zu identifizieren. Am Ende konnten jene noch in CD4- bzw. CD8 positive Zellen unterteilt werden, indem die Zellen in den Kanälen UV1-A und APV-Vio770-A durchleuchtet wurden. Dieselbe Gating-Strategie wurde auf die MOCK angewendet.

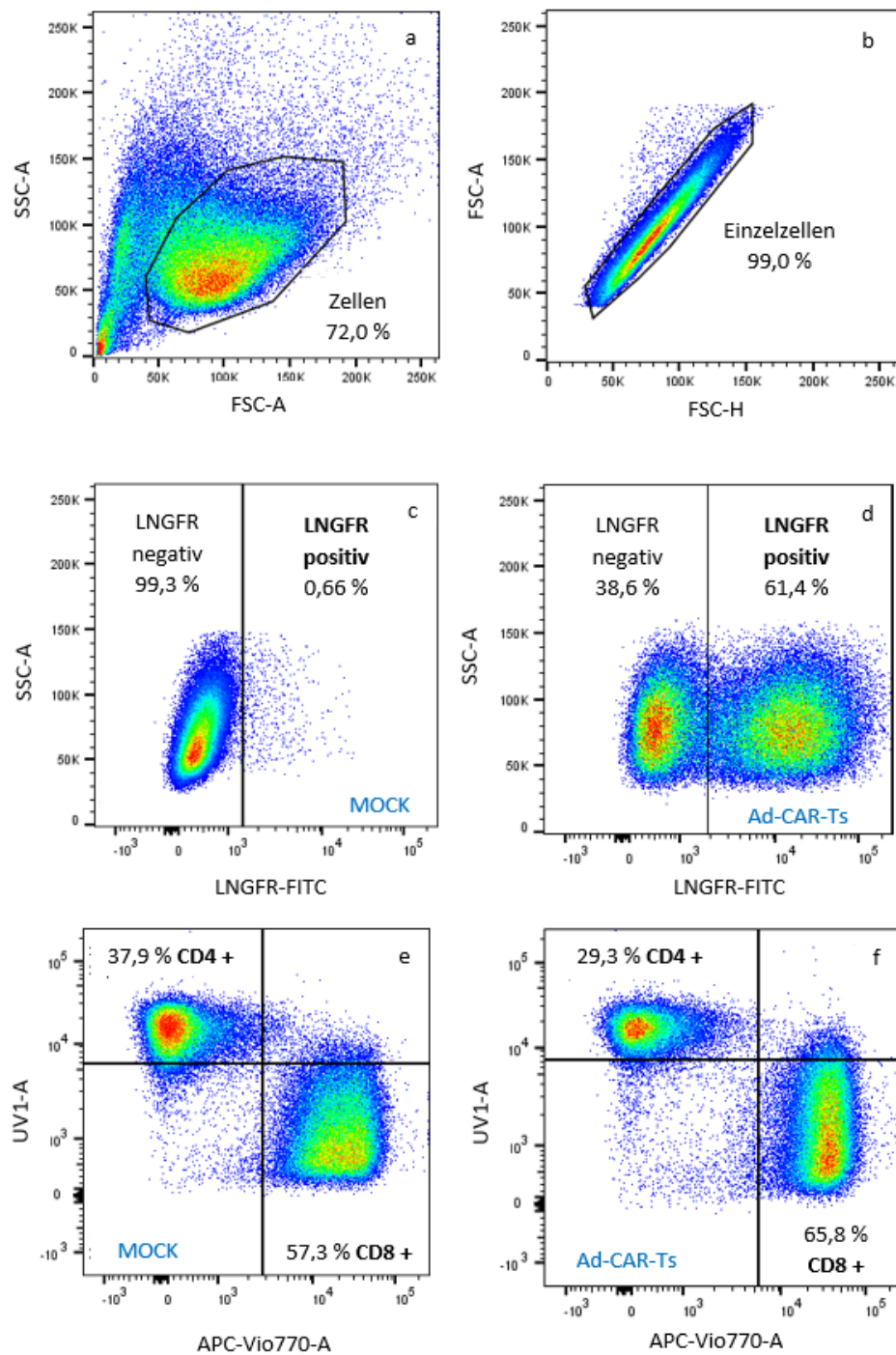


Abbildung 9: FC Gating-Strategie und LNGFR-Expression der MOCK-T-Zellen und AdCAR-T-Zellen mit CD4/CD8-Verteilung

a) Zellpopulation. Abgrenzung lebender (X-Achse FSC-A, Y-Achse SSC-A, 72 %) und toter Zellen
b) Selektion der Einzelzellen (X-Achse FSC-H, Y-Achse FSC-A, 99 %) **c)** LNGFR-Expression der MOCK-T-Zellen als Negativkontrolle (X-Achse LNGFR-FITC, Y-Achse SSC-A, 99,3 %) **d)** Expression der AdCAR-T-Zellen (X-Achse LNGFR-FITC, Y-Achse SSC-A, 61,4 %) **e)** CD4⁺ - CD8⁺ Verteilung der MOCK-T-Zellen (X-Achse APC-Vio770-A, Y-Achse UV1-A, 37,9 % CD4⁺, 57,3 % CD8⁺) **f)** CD4⁺-CD8⁺ Verteilung der AdCAR-T-Zellen (X-Achse APC-Vio770-A, Y-Achse UV1-A, 29,3 % CD4⁺, 65,8 % CD8⁺)

2.8. LNGFR-MACS (Optional)

Wenn die LNGFR-Expression der AdCAR-T-Zellen unter 50% lag, wurden die Zellen gemacst. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 250 g, R9/7, 10 min) und dann in 320 µl MP pro 4×10^7 Zellen aufgenommen und mit 80 µl LNGFR-Beats pro 4×10^7 Zellen 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten gleich wie beim CD4/CD8-MACS mit dem Unterschied, dass die Magnetsäule nicht dreimal, sondern viermal gewaschen wurde. Am Ende wurden die Zellen in CAR-Medium aufgenommen mit einer Dichte von 3-4 Millionen pro ml.

2.9. Herstellung zytokinfreier AdCAR-T-Zellen

Damit die AdCAR-T-Zellen in den Versuchen keine hohe unspezifische Lyse zeigen, wurden sie „kaltgestellt“. Das bedeutet, sie wurden 72 h (oder 96h bei den U-937) auf Zytokinentzug gesetzt. Dazu wurde die gewünschte Anzahl zentrifugiert (20 °C, R9/7, 250 g, 10 Minuten). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, sodass kein Tropfen Zytokin-Medium im Falcon verbleibt. Aufgenommen wurden die Zellen dann in eine neue Zellkulturflasche in ein Medium, das nur aus TexMACS und Penicillin/ Streptomycin (200 ml TexMACS und 2 ml PS). Die Zieldichte lag bei 1 Millionen Zellen pro ml.

3. Luciferase-basierter Zytotoxizitäts-Assay

Hintergrund

Luciferasen sind Enzyme, die die Oxidation von Luciferin katalysieren. Die instabilen Zwischenprodukte Dioxetane oder Dioxetanone zerfallen unter Biolumineszenz. Hierbei werden zwei unterschiedliche Arten von Luciferasen unterschieden, wobei die Firefly-Luciferasen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* in dieser Arbeit eine Rolle spielt. Das Gen kann mittels viraler Transduktion in menschliche Zellen eingebracht werden, wobei beispielsweise GFP als Reporter gen dient. Katalysiert wird hierbei die Reaktion von D-Luciferin, ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, Kohlendioxid, AMP und Licht (Vgl. Abbildung 10). Bei dieser oxidativen Decarboxylierung entstehen Lichtemissionen im gelb-grünen Bereich von 550-570 nm. Diese können in einem Luminometer gemessen werden. Die Lichtstärke ist proportional zur Luciferase-Aktivität, welche von der Zahl der Luciferase-tragenden Zellen, also den Tumorzellen abhängt. Dadurch ist es möglich die Anzahl der Tumorzellen zu verfolgen und eine Lyse zu berechnen [94, 95].

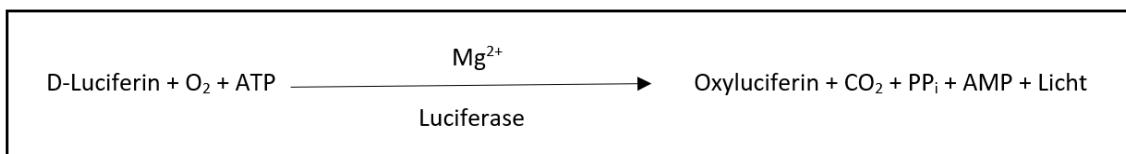


Abbildung 10: Luciferase-Reaktion

Reaktion von D-Luciferin, Sauerstoff (O_2) und Adenosinriphosphat (ATP) zu Oxyluciferin, Kohlendioxid (CO_2), Pyrophosphat (PP_i), Adenosinmonophosphat (AMP) und Licht katalysiert durch Magnesium (Mg^{2+}) und das Enzym Luciferase.

Durchführung

Für diesen Versuch wurden 96-Well-Platten verwendet. Das Zielvolumen in jedem Well betrug 200 μl . Spalte 1 und 12 waren stets 100 %-Kontrollen Zeile A-F von Spalte 9-11 war stets die Tumortitration als Kontrolle. Je nach Ziel des Versuchs wurden die restlichen Felder unterschiedlich pipettiert. In Tabelle 1 (S34) ist das allgemeine Titrationsschema für die 96-Well-Platte dargestellt. Tabelle 2 (S34) zeigt die genauen Konditionen und Rechenschritte der einzelnen Wells.

Tabelle 1: Allgemeines Titrationsschema für Luciferase-Assays auf einer 96-Well-Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100% Kontrolle								100% Kontrolle			100% Kontrolle
B									75% Kontrolle			
C									50% Kontrolle			
D									25% Kontrolle			
E									10% Kontrolle			
F									0% Kontrolle			
G												
H												

Tabelle 2: Konditionen des allgemeinen Titrationsschemas der Luciferase-Assays für eine 96-Well-Platte

100%-Kontrolle	50 µl Target + 50 µl Luciferin + 100 µl Medium
Tumortitration	50 µl Target (In Eppendorfcups gemischt, s.u.) + 50 µl Luciferin + 100 µl Medium <ul style="list-style-type: none"> • 75 %: 150 µl Target + 50 µl Medium • 50 %: 100 µl Target + 100 µl Medium • 25 %: 50 µl Target + 150 µl Medium • 10 %: 20 µl Target + 180 µl Medium
0%-Kontrolle	150 µl Medium + 50 µl Luciferin
Antikörper	50 µl Target + 50 µl Effektor + 50 µl AK + 50 µl Luciferin
no mAb Control	50 µl Target + 50 µl Effektor + 50 µl Luciferin + 50 µl Medium

Als erstes wurde die Dichte der Tumorzellen gemessen, die gewünschte Zellzahl entnommen, zentrifugiert (20 °C, 300 g, R9/9, 10 Minuten) und anschließend mit einer Zielkonzentration von 1 Millionen pro ml in neues Tumormedium aufgenommen. Daraus konnte nun die Tumortitration nach oben beschriebenem Schema erfolgen. In jedes Well wurden 50 µl pipettiert, wodurch im Endeffekt 50000 Tumorzellen pro Well waren.

Dasselbe wurde mit den AdCAR-T-Zellen gemacht, die jedoch bei 20 °C, 270 g, R9/7 zentrifugiert wurden. Auch diese wurden in Tumormedium aufgenommen. Die AdCAR-T-Zellen wurden je nach Tumorzelllinie in einer anderen E:T-Ratio (Effektor-Target-Ratio) zugegeben. Bei den U-937 und HL-60 lag sie bei 1:1 (50000 Zellen pro Well). Bei den MOLM-13 ebenfalls bei 1:1 (48 h-Werte) bzw. bei 5:1 (250000 Zellen pro Well, 24 h-Werte). Hierbei ist zu beachten, dass die verwendeten AdCAR-T-Zellen zuvor 48 h (U-937) bzw. 72 h (MOLM-13, HL-60) in zytokinfreiem Medium gehalten wurden. Außerdem wurden die AdCAR-T-Zellen je nach LNGFR-Expression auf 100% normalisiert. War die Expression bei 50 %, wurde also die doppelte Menge an Zellen verwendet. Für die Luciferase-Assays wurden nur Ad-CAR-T-Zellen mit einer LNGFR-Expression von >50% verwendet.

Im nächsten Schritt wurden 50 µl Antikörpermischung in die entsprechenden Wells gefüllt. Die Antikörper wurden je nach Versuch in unterschiedlichen Mengen Medium aufgenommen, um die gewünschte Zielkonzentration zu erreichen. Die verwendeten Antikörper hierbei waren bCD33, bCD32, bCD38, bCD123, bCD305 und bCD371.

Als letztes wurde in jedes der 96 Wells 50 µl des Luciferingemischs gegeben, Dies setzte sich zusammen aus 5 ml Tumormedium und einem Aliquot D-Luciferin. Jedes Aliquot bestand aus 50 µl in DMSO gelöstem synthetischem D-Luciferin der Konzentration 0,1 µg/µl. Hochgerechnet auf ein 200 µl-Well betrug die Luciferinkonzentration also 0,25 µg/ml.

Die Platten inkubierten nun im dunklen Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Gemessen wurde die Lumineszenz der Platten mit Hilfe des Victor 1420 Multilabel Counters je nach Versuch nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Berechnung der Lysewerte erfolgte nun per Microsoft Excel. Hierbei diente die Tumortitration als Kontrolle für die übrigen Wells.

3.1. E:T-Titration

Im ersten Schritt fand eine E:T (Effektor zu Target) Titration statt. Hierbei wurde der Antikörper bCD33 verglichen mit einem Kontroll-Antikörper und mit Feldern ohne Antikörper. Dieser Versuch war die Grundlage dafür, mit welcher E:T die folgenden Antikörpertitrationen pipettiert wurden. Ziel hierbei war es den Wert zu nehmen, bei dem eine hohe Lyse stattfand, die unspezifische Lyse ohne Antikörper bzw. mit Kontroll-Antikörper jedoch so gering wie möglich war. In Tabelle 3 ist das Titrationsschema zu diesem Versuch dargestellt.

Tabelle 3: Titrationsschema E:T-Titration auf einer 96-Well-Platte

Schema zur Effektor-Target-Titration von bCD33 (hellgrau), mAb control (rot) und ohne Antikörper (blau). Die genauen Konditionen pro Well können aus Tabelle 2 entnommen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100 % Kontrolle	10:1			10:1			100% Kontrolle	100 % Kontrolle			100 % Kontrolle	
B		5:1			5:1				75 % Kontrolle				
C		2:1			2:1				50 % Kontrolle				
D		1:1			1:1				25 % Kontrolle				
E		0,5:1			0,5:1				10 % Kontrolle				
F		0,25:1			0,25:1				0 % Kontrolle				
G		10:1			2:1				0,5:1		100 %		
H		5:1			1:1				0,25:1		Kontrolle		

3.2. Antikörper-Titration

Tabelle 4: Titrationsschema Antikörpertitration auf einer 96-Well-Platte

Schema zur Antikörpertitration von Antikörper 1 (hellgrau), Antikörper 2 (grün), ohne Antikörper (no mAb, blau) und Kontrollantikörper (Control mAb, rot). Die genauen Konditionen pro Well können aus Tabelle 2 entnommen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100 % Kontrolle	Antikörper 1			Antikörper 2			100% Kontrolle	100 % Kontrolle			100 % Kontrolle	
B									75 % Kontrolle				
C									50 % Kontrolle				
D									25 % Kontrolle				
E									10 % Kontrolle				
F									0 % Kontrolle				
G									Control mAb		100 %		
H					no mAb				Control mAb		Kontrolle		

Im nächsten Schritt erfolgte zunächst eine grobe Titration der sechs Antikörper. Hierbei wurden die Konzentrationen 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 0,001 ng pipettiert. Das genaue Titrationsschema ist in Tabelle 4 veranschaulicht. Bei der Auswertung der Daten konnte nun der Bereich näher bestimmt werden, in dem der so genannte Cut-off-Wert lag, das heißt der Wert, bei dem gerade so keine Zytolyse mehr stattfindet. Um diesen Wert genauer einzugrenzen, folgte daher nun eine feine Titration der Antikörper. Diese unterschied sich je nach Antikörper und bewegte sich im Bereich von 1000 pg bis 10 pg. Die Ergebnisse dieser feinen Titration waren nun die Grundlage für die Kombination-Versuche.

3.3. Antikörper-Kombination

Tabelle 5: Titrationsschema Antikörperkombination auf einer 96-Well-Platte

Schema zur Darstellung der einzelnen Antikörper (hellgrau), der Kombination der 5 Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (dunkelblau), ohne Antikörper (blau) und Kontrollantikörper bmAb Control (rot). Die genauen Konditionen pro Well können Tabelle 2 entnommen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	100 % Kontrolle	bCD33 Kombi1		bCD33 Kombi2		Control bmAb	100 % Kontrolle					100 % Kontrolle			
B		bCD371 Kombi1		bCD371 Kombi2			75 % Kontrolle								
C		bCD32 Kombi1		bCD32 Kombi2			50 % Kontrolle								
D		bCD305 Kombi1		bCD305 Kombi2			25 % Kontrolle								
E		bCD38 Kombi1		bCD38 Kombi2			10 % Kontrolle								
F		Kombination 1							0 % Kontrolle						
G		Kombination 2							Control bmAb		100 %				
H		no mAb							Control bmAb		Kontrolle				

Kombiniert wurden hierbei immer die fünf Antikörper bCD32, bCD33, bCD38, bCD305 und bCD371. Bei der Kombination von 5 Antikörpern wurden von jedem einzelnen 10 µl pipettiert, um im gesamten wieder auf die 50 µl zu kommen. Damit die Zielkonzentration jedoch dieselbe bleibt, wurde das 5-fache der gewünschten Antikörpermenge berechnet und dann nur 10 µl anstatt 50 µl benutzt. Das genaue Titrationsschema ist in Tabelle 5 dargestellt.

Diese Versuche wurden für jede Zelllinie einzeln durchgeführt.

4. FC-Analyse

Primärfärbung

Um die gewünschte Probe zu färben, wurde sie zunächst mit 2 ml MP gewaschen (4 °C, 400 g, R9/7, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt und je 3 µl oder 5 µl des primären Antikörpers hinzugegeben. Bei diesen Versuchen handelte es sich meist um 3 µl des Antikörpers CD3-APC. Der Antikörper wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich wieder mit 2 ml MP gewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und die Probe war bereit zur Messung.

Sekundärfärbung

Wenn stattdessen eine Färbung mit einem sekundären Antikörper gewünscht war, war das Vorgehen zunächst dasselbe wie bei der Primärfärbung. Doch nun wurde nach der zweiten Waschung der zweite Antikörper hinzugefügt, wiederum 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2 ml MP gewaschen. Die hierbei verwendeten primären Antikörper waren dieselben wie bei den Luciferase-Assays. Als sekundärer Antikörper diente Anti-Biotin-APC.

5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Luciferase-Assays erfolgte in Microsoft Excel mit Hilfe einer einheitlichen Auswertungstabelle. Aus den gemessenen Lumineszenz-Werten wurde die verbliebene Menge an Targetzellen pro Well ermittelt. Hierbei dienten die 0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Kontrollen als Anhaltspunkt für eine Ausgleichsgerade, mit derer Hilfe die exakte Menge an Targetzellen ermittelt werden konnte. Durch Subtraktion der verbliebenen Targetzellen von 100 % konnte die Lyse berechnet werden. Die Lysewerte wurden schließlich in die Software GraphPad Prism 7.0 eingefügt und in Tabellen und Schaubilder umgesetzt.

Die FC-Versuche wurden ebenfalls mit GraphPad Prism 7.0. ausgewertet und graphisch veranschaulicht. Zum Vergleich der verschiedenen Gruppen wurde der One-way ANOVA (analysis of variance) genutzt, mit dem die Mittelwerte von zwei oder mehr Datensätzen miteinander verglichen und auf ihre Signifikanz untersucht werden können. Diese Signifikanz wird als p-Wert angegeben, der in Tabelle 6 genauer definiert ist. Als Post-hoc-Test wurde der Tukey's multiple comparison test verwendet, um die Mittelwerte der einzelnen Datensätze miteinander zu vergleichen.

Tabelle 6: Graphische Darstellung der Signifikanzniveaus

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

Ein Ethikvotum liegt vor: 761/2015B02

6. Materialliste

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) 20-200µl	HTL (Warschau, POL)
Pipetten: Pipetman 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl Research 2,5µl, 20µl	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	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
ABL800 Flex Blutgasanalysator	Radiometer GmbH (Krefeld, D)

Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen: 20µl, 200µl, 1000µl	Ratiolab (Dreieich, D) Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Spritzen, steril: 1ml, 50ml	Braun (Melsungen, D) BD Plastipak (Franklin Lakes, USA)
Einmalpipetten, Plastik, steril: Stripette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning (Corning, USA)
Reaktionsgefäße, PP, 1,5ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Kryoröhrchen, PP, steril, 2ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
FACS-Röhrchen, Rundboden, PS, 5ml	Corning (Corning, USA)
Falcon, PP, steril: 15ml, 50ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturflaschen, steril: Cellstar 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatten, steril: 24-well, 96-well	Corning (Corning, USA)
Cellstar Mikroplatten, Flachboden, weiß, 96-well	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellsieb, 40µm	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Parafilm Verschlussfolie	Bemis (Oshkosh, USA)
Safety-Multifly Butterfly 23G, 200mm	Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Kombistopfen rot	Fresenius (Bad Homburg, D)

Sterican Injektions-Kanüle	Braun (Melsungen, D)
Softasept Haut-Desinfektionsspray	Braun (Melsungen, D)
Descosept Flächendesinfektionsspray	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)
Aseptoman Händedesinfektionsmittel	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)

Chemikalien und Reagenzien

Phosphate Buffered Saline (PBS), 500 ml Lot: RNBG6525	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RPMI 1640 Medium, 500 ml F1215	Biochrom GmbH (Berlin, D)
TexMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie Medical (Steinbach, D)
Fetales Kälberserum (FCS), 500 ml Lot: 42G8286K, REF: 10270-106	Gibco (Carlsbad, USA)
Biocoll Separating Solution, 500 ml Lot: 0042F L6115	Biochrom (Berlin, D)
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm (Ulm, D)
L-Glutamin 200 mM, 50 ml Lot: 0035G	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin 10 000 U/ml + Streptomycin 10 000 µg/ml, 100 ml Lot: 0759G	
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD3-VioBlue, BW264/56 Ord: 130-094-363, Lot: 5171109708	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8-APC-Vio770, BW135/80, human Ord: 130-096-561, Lot: 5160217378	
CD271 (LNGFR)-FITC, human, 1ml Ord: 130-091-917, Lot: 5170810322	

Anti-Biotin-APC Ord: 130-090-856, Lot: 5170824235	
CD4-BUV395, Clone: SK3, 0,5ml Lot: 7138963	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
CD14-APC, REF: 345787	
BD™ CompBeads Anti-Mouse-Ig,k Cat: 51-90-9001229, Lot: 4101845	
BD™ CompBeads negative control Cat: 51-90-9001291, Lot: 7017757	
Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye, Cat: 425101	BioLegend (San Diego, California)
Human IL-7, premium grade	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Human IL-15, premium grade	
CD4 MicroBeads, human, 2ml Ord: 130-045-101, Lot: 5180711122	
CD8 MicroBeads, human, 2ml Ord: 130-045-201, Lot: 5180705357	
CD14 MicroBeads, human, 2ml Ord: 130-050-201, Lot: 5180913211	
MACSelect™ LNGFR MicroBeads, 2ml Ord: 130-091-330, Lot: 5171103160	
T Cell TransAct, human, 2ml Ord: 130-111-160, Lot: 5180309362	
CD32-Biotin, REA997 (250µg/ml) Ord: 130-116-597, Lot: 5180430465	
CD33-Biotin (22µg/ml) Ord: 130-098-916, Lot: 5170523378	
CD38-Biotin, REA572 (22µg/ml) Ord: 130-110-242, Lot: 5180430174	
CD123-Biotin, REA918 (20µg/ml) Ord: 130-115-262, Lot: 5180430466	

CD123-Biotin, AC145 (150µg/ml) Ord: 130-113-324, Lot: 5180821106	
CD305 (LAIR-1)-Biotin, REA447(44µg/ml) Ord: 130-106-804, Lot: 5180430468	
CD371 (CLEC12A)-Biotin (5,5µg/ml) Ord: 130-106-433, Lot: 5170202160	
CD56-Biotin, REA196 (11µg/ml) Ord: 130-113-311, Lot: 5181026361	
CD200-Biotin, REA1067 (11µg/ml) Ord: 130-118-135, Lot: 5181026407	
REA Control-Biotin (30µg/ml) Ord: 130-104-622, Lot: 5180430163	

Zellkultur

HL-60	Miltenyi Biotec GmbH
U-937	
MOLM-13	
Aus peripherem Vollblut gewonnene T-Zellen	Freiwillige, gesunde Spender: D1-D6
Tumormedium	500ml RPMI-Medium + 100ml FCS (20%) + 5ml Penicillin/Streptomycin + 5ml L-Glutamin
aCAR-T-Zellmedium	TexMACS Medium 200ml + 2ml Penicillin/Streptomycin + 200µl IL-7 (10µg/ml) + 100µl IL-15 (10µg/ml)
HEK-293T (Lentivirus No 4lipo)	Clontech (Mountain View, USA)

III. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Versuche dargestellt. Zu Beginn erfolgte die Charakterisierung der Tumorzellen. Die Fluoreszenz, Antigenexpression, Mean Fluorescence Intensity (MFI) und Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) wurden durch FC-Analyse ermittelt (Vgl. II.4.).

Es erfolgte eine Qualitätskontrolle der AdCAR-T-Zellen, um zu eruieren, ob diese für die geplanten Versuche geeignet sind. Hierzu wurde mit Hilfe einer FC-Analyse die LNGFR-Expression und die CD4-CD8-Verteilung der Zellen bestimmt (Vgl. II.2.7).

In den durchgeführten zytotoxischen Experimenten wurden lediglich AdCAR-T Zellen verwendet, die eine ausgeglichene CD4/8 Verteilung sowie eine CAR-Expression > 50 % aufwiesen.

Die Zytotoxizität wurde mittels Luciferase-basiertem Assay ermittelt (Vgl. II.3). Es erfolgte eine Normalisierung der Effektor zu Target Ratio (E:T) entsprechend der CAR-Expression, d.h. die Angabe der E:T bezieht sich auf das Verhältnis von AdCAR-T Zellen zu Tumorzellen.

Zur Messung der Zytotoxizität von AdCAR-T Zellen wurden in dieser Arbeit die akuten myeloischen Leukämiezelllinien HL-60, U-937 und MOLM-13 verwendet.

In der Durchführung der Zytotoxizitäts-Assays wurden neben AdCAR-T und Tumorzellen biotinylierte Antikörper als Adaptermoleküle verwendet.

Im ersten Schritt erfolgte eine E:T-Titration (Vgl. II.3.1). Mit der E:T-Titration sollte als Hauptkriterium das optimale Verhältnis von AdCAR-T zu Tumorzellen eruiert werden, bei dem keine unspezifische Lyse, d.h. Zytolyse von Tumorzellen ohne Adaptermolekül oder mit Adaptermolekül irrelevanter Spezifität (Kontrollantikörper), stattfindet. Als Zweitkriterium sollte eine E:T verwendet werden, bei der noch eine möglichst hohe spezifische Lyse durch die Kombination aus AdCAR-T plus Adaptermolekül stattfindet.

Im zweiten Schritt erfolgte eine Titration der Antikörperkonzentration in der im ersten Schritt identifizierten E:T mit dem Ziel, eine Schwellendosis zu identifizieren, ab welcher eine spezifische Lyse objektivierbar war (Vgl. II.3.2).

Folglich wurde im ersten Schritt der Einfluss der E:T und im zweiten Schritt der Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Tumorzelllyse bestimmt. Im Weiteren erfolgte eine Kombinationstestung verschiedener Antikörper mit der identifizierten jeweiligen subtherapeutischen Schwellendosis (Vgl. II.3.3). Hierdurch sollte das neue therapeutische Prinzip der Surface-Activation-Matrix veranschaulicht werden. Zusammengefasst bedeutet dies, dass mit einem einzelnen Antikörper in subtherapeutischer Dosierung keine spezifische Lyse, jedoch in der Kombination mehrerer Antikörper in subtherapeutischer Dosierung eine überzeugende Lyse induziert werden kann.

1. Charakterisierung der Tumorzellen

1.1. Fluoreszenz-Testung

Für die verschiedenen Experimente wurden Tumorzellen verwendet, die zuvor durch virale Transduktion mit einem Farbstoff (mCherry oder GFP) angefärbt wurden. Um zu eruieren, wie viele der Zellen tatsächlich positiv waren, wurde mittels FC-Analyse der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die in der gewünschten Farbe leuchten. Die HL-60 Zellen leuchteten in mCherry, die U-937 und MOLM-13 in GFP.

Tabelle 7: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP in Prozent (%)

	GFP	mCherry
HL-60	-	100 %
U-937	94,6 %	-
MOLM-13	98,2 %	-

In Tabelle 7 ist die Fluoreszenz der Tumorzellen in GFP bzw. mCherry in der FC-Analyse dargestellt. Die HL-60-Leukämiezellen zeigten eine mCherry-Expression von 100 %. Die U-937 waren zu 94,6 % und die MOLM-13-Zellen zu 98,2 % GFP-positiv.

In Abbildung 11 (S48) sind die Analysen der Expressionsverhältnisse aus Tabelle 6 im FC-Programm und als Histogramm nochmals veranschaulicht.

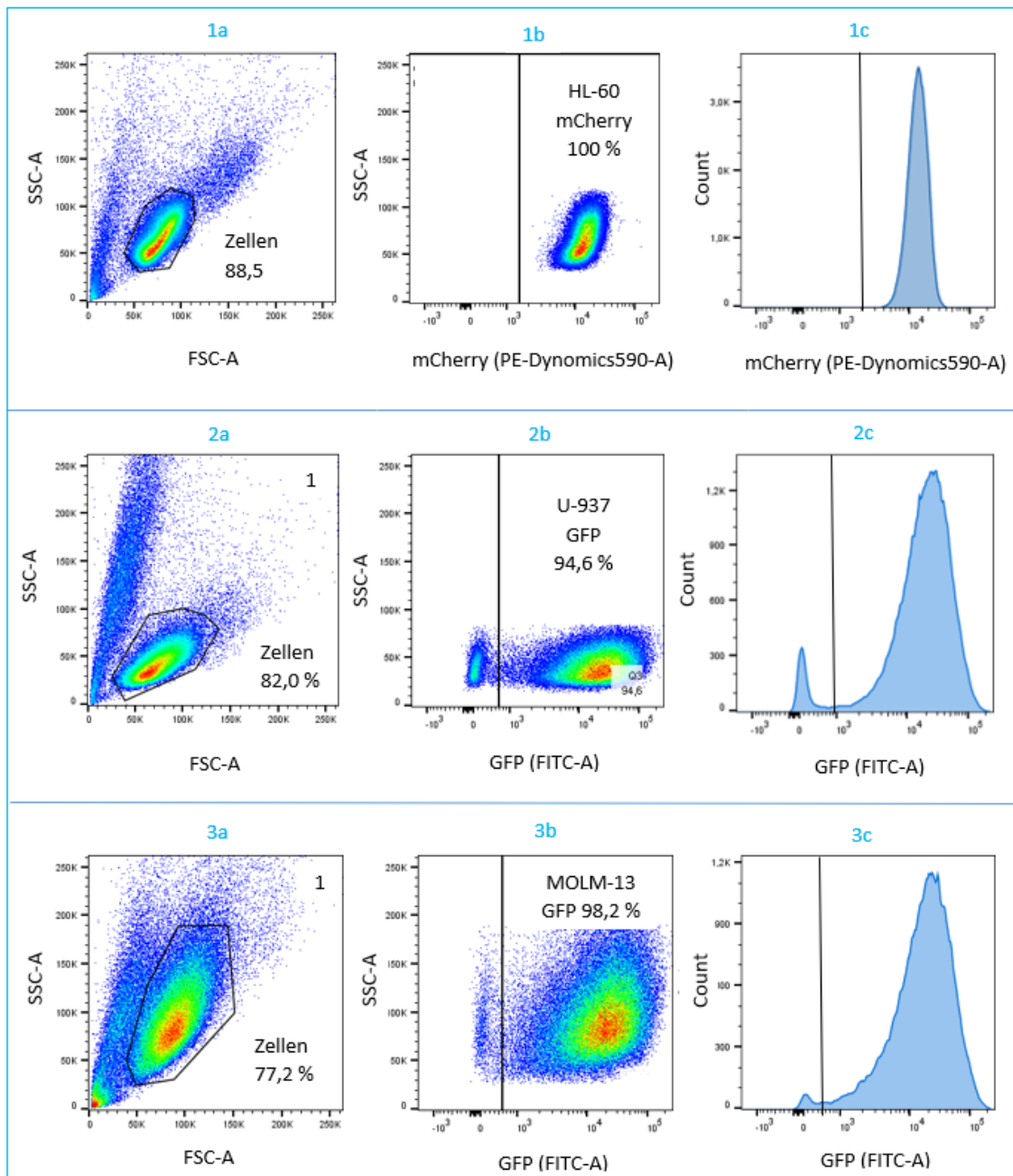


Abbildung 11: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP im FC-Versuch

- 1) HL-60: 1a) Zellpopulation (88,5 %), 1b) mCherry positiv (100 %), 1c) mCherry positiv Histogramm (100 %)
- 2) U-937: 2a) Zellpopulation (82,0 %), 2b) GFP positiv (94,6 %), 2c) GFP positiv Histogramm (94,6 %)
- 3) MOLM-13: 3a) Zellpopulation (77,2 %), 3b) GFP positiv (98,2 %), 3c) GFP positiv Histogramm (98,2 %)

1.2. Antigenexpression

Um die Antigene, welche zur Versuchsdurchführung genutzt wurden, und deren Expression auf den Tumorzellen genauer zu bestimmen, wurde mit FC-Assays die Expression im Vergleich zu einer Isotypkontrolle gemessen. In Tabelle 8 sind die einzelnen Antigenexpressionen auf den Leukämiezelllinien HL-60, U-937 und MOLM-13 dargestellt.

Tabelle 8: Antigenexpression ausgewählter biotinylierter Antikörper auf Leukämiezellen

Expression der Antikörper bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305, bCD371 auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13 im FC-Versuch in Prozent.

Antigen	Anteil positiver Zellen (%)		
	HL-60	U-937	MOLM-13
bCD32	19,9	98,8	92,5
bCD33	99,4	99,8	100
bCD38	26,8	99,8	100
bCD123	27,4	1,6	76,8
bCD305	99,9	99,9	99,9
bCD371	98,8	100	18,7

■ 0 % - 24,9 %

■ 25 % - 49,9 %

■ 50 % - 74,9 %

■ 75 % - 100 %

Der Antikörper bCD33 ist besonders gut auf allen drei Tumorzelllinien exprimiert, weshalb er als „klassischer“ Antikörper für weitere Versuche wie die nachfolgende E:T-Titration verwendet wurde. Die HL-60-Zellen zeigten hohe Expressionen der Antikörper bCD33, bCD305 und bCD371. Auf der Oberfläche der U-937-Leukämiezellen waren alle Antikörper hoch positiv außer bCD123, der folglich nicht für die Versuche verwendet wurde. MOLM-13 dagegen zeigte hohe Expressionen von allen Antigenen außer bCD371, welches folglich bei dieser Zelllinie nicht für die Versuche genutzt wurde.

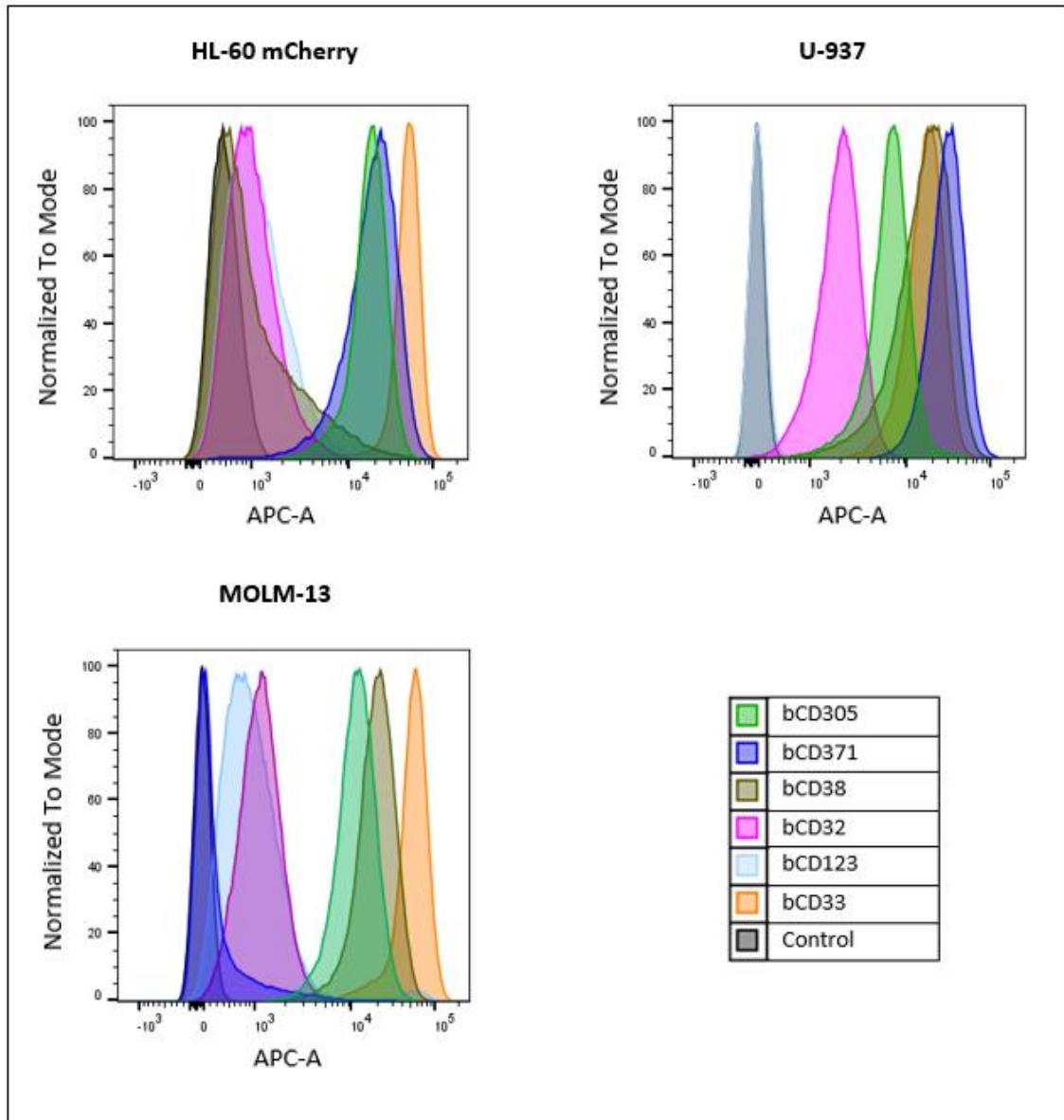


Abbildung 12: Antigenexpression ausgewählter biotinylierter Antikörper auf den Tumorzellen

Expression der Antikörper bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305, bCD371 auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13 im FC-Versuch. Histogramm.

Die Abbildung 12 veranschaulicht nochmals die in Tabelle 8 ermittelten Expressionen der verschiedenen biotinylierten Antikörper auf den Tumorzellen im Vergleich zu einem negativen Kontrollantikörper (control) im Histogramm.

1.3. MFI und MFIR

Die Mean Fluorescence Intensity (MFI) beschreibt im Allgemeinen die relative Helligkeit einer Probe. Angewandt auf die hier durchgeführten Assays hat sie den Zweck, eine Aussage darüber zu geben, wie stark die einzelnen Zelllinien leuchten, das heißt wie stark die einzelnen Zellen mit den gemessenen Antigenen besetzt sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Mean Fluorescence Intensity verschiedener biotinylierter Antikörper auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13

Antigen	MFI		
	HL-60	U-937	MOLM-13
<i>Control Anti-Biotin-APC</i>	470	75,8	82,2
<i>bCD32</i>	968	1964	1136
<i>bCD33</i>	49081	16306	54350
<i>bCD38</i>	793	16268	19529
<i>bCD123</i>	1036	86,1	849
<i>bCD305</i>	17449	6432	11299
<i>bCD371</i>	19165	29377	158

Die Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) gibt die relative Leuchtkraft der einzelnen Antikörper im Vergleich zum Kontrollantikörper Anti-Biotin-APC an.

Tabelle 10: Mean Fluorescence Intensity Ratio verschiedener biotinylierter Antikörper in Bezug zum Kontrollantikörper Anti-Biotin-APC auf den Leukämiezellen HL-60, U-937 und MOLM-13

Antigen	MFIR		
	HL-60	U-937	MOLM-13
<i>bCD32</i>	2,1	25,9	13,8
<i>bCD33</i>	104,4	215,1	661,2
<i>bCD38</i>	1,7	214,6	237,6
<i>bCD123</i>	2,2	1,1	10,3
<i>bCD305</i>	37,1	84,9	137,5
<i>bCD371</i>	40,8	387,6	1,9

2. Qualitätskontrolle der AdCAR-T-Zellen

Zunächst erfolgte eine Qualitätskontrolle der AdCAR-T-Zellen, um zu eruieren, ob diese für die geplanten Versuche geeignet sind. Hierzu wurde mit Hilfe einer FC-Analyse die LNGFR-Expression und die CD4-CD8-Verteilung der Zellen bestimmt (Vgl. II.2.7).

In Schaubild 13 (S53) ist exemplarisch das Vorgehen bei der Qualitätskontrolle dargestellt. Nachdem die toten Zellen und die Dupletten herausgated wurden, konnte im Vergleich zu den LNGFR-Negativen MOCK-T-Zellen als Referenzprobe die LNGFR-Expression der AdCAR-T-Zellen bestimmt werden.

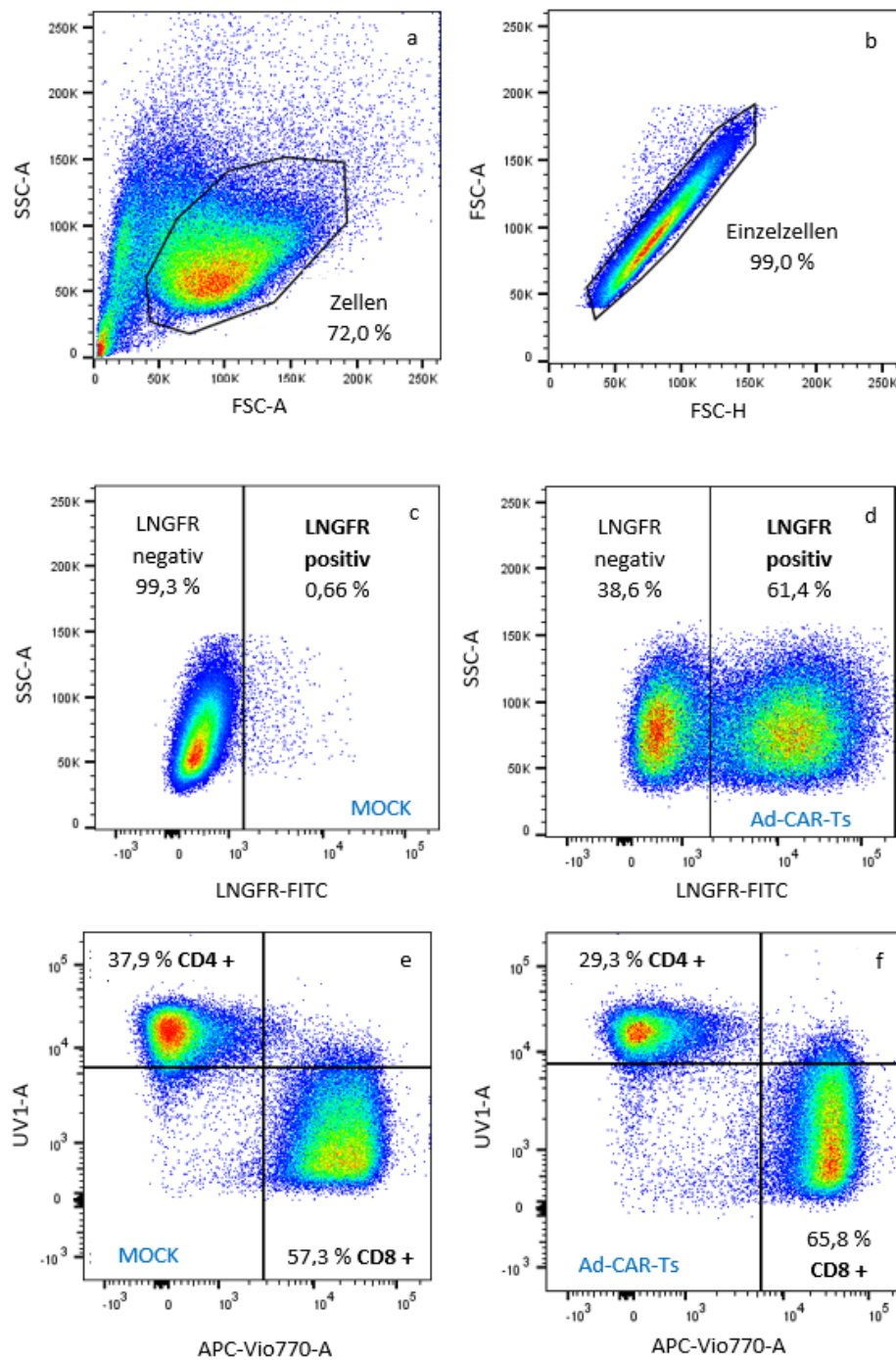


Abbildung 13: Fluoreszenz der Tumorzellen HL-60 in mCherry, U-937 in GFP und MOLM-13 in GFP im FCS-Versuch

a) Zellpopulation. Abgrenzung lebender (X-Achse FSC-A, Y-Achse SSC-A, 72 %) und toter Zellen
b) Selektion der Einzelzellen (X-Achse FSC-H, Y-Achse FSC-A, 99 %) **c)** LNGFR-Expression der MOCK-T-Zellen als Negativkontrolle (X-Achse LNGFR-FITC, Y-Achse SSC-A, 99,3 %) **d)** Expression der AdCAR-T-Zellen (X-Achse LNGFR-FITC, Y-Achse SSC-A, 61,4 %) **e)** CD4⁺ - CD8⁺ Verteilung der MOCK-T-Zellen (X-Achse APC-Vio770-A, Y-Achse UV1-A, 37,9 % CD4⁺, 57,3 % CD8⁺) **f)** CD4⁺ - CD8⁺ Verteilung der AdCAR-T-Zellen (X-Achse APC-Vio770-A, Y-Achse UV1-A, 29,3 % CD4⁺, 65,8 % CD8⁺)

3. Normalisierung der AdCAR-T-Zellen

Um die Versuche möglichst vergleichbar zu machen und nicht einmal mit 50 % und ein anderes Mal mit 80 % LNGFR-Expression zu arbeiten, wurden die Zellen auf 100 % normalisiert und die entsprechende Menge für die Versuche genutzt. Für die Luciferase-Assays wurden nur AdCAR-T-Zellen verwendet, die eine LNGFR-Expression von >50 % aufwiesen. Die einzelnen Expansionen sind mit Spender, LNGFR-Expression und CD4-CD8-Verteilung in Tabelle 11 in zeitlicher Abfolge nummeriert aufgelistet.

Tabelle 11: AdCAR-T-Zell-Expansionen (Nr. 1 bis 20), Spender (D1-D6), LNGFR-Expression in % und CD4-CD8-Verteilung in %

Expansion Nr.	Spender	LNGFR (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)
1	D1	68	35	65
2	D6	62	32	68
3	D2	12	0	65
4	D1	62	38	62
5	D6	37	18	81
6	D2	66	0	61
7	D1	60	32	68
8	D1	59	34	63
9	D2	0	37	48
10	D6	39	11	84
11	D2	70	53	47
12	D6	39	60	39
13	D3	59	43	56
14	D3	71	39	61
15	D2	70	50	50
16	D2	71	63	36
17	D2	0	-----	-----
18	D2	42,5	60	40
19	D1	47	49	49
20	D2	52	38	58

4. Luciferase-basierte Zytotoxizitäts-Assays

4.1. HL-60

4.1.1. E:T-Titration

Bei der Effektor-Target-Titration der Zelllinie HL-60 wurden drei verschiedene Konditionen miteinander verglichen. Ziel war es, die beste E:T Ratio für die Antikörper-Titration zu eruieren. Als Adapter wurden der biotinylierte Antikörper bCD33 und der biotinylierte Kontrollantikörper bmAb-control verwendet. Es wurde geprüft, bei welcher E:T eine zuverlässige Lyse >50 % und gleichzeitig eine möglichst geringe unspezifische Lyse ohne Antikörper bzw. mit Kontrollantikörper stattfindet. Vor der Messung mit einem Luminometer wurden die Ansätze 24 h inkubiert. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse dieser Messung.

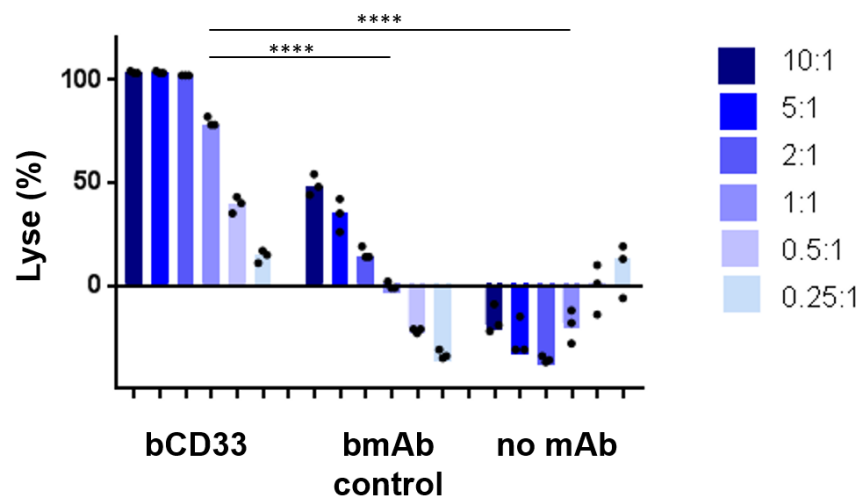


Abbildung 14: HL-60 E:T-Titration

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Effektor-Target-Titration von AdCAR-T-Zellen gegen HL-60-Leukämiezellen mit dem biotinylierten Antikörper CD33 (bCD33, 10 ng/ml), einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 10 ng/ml) und ohne Antikörper (no mAb) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Technische Replikate $n = 3$, Versuche $n = 1$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey, Signifikanz der Ziel-E:T (1:1) markiert.

Im Fall der HL-60 wurde eine E:T von 1:1 festgelegt, wobei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) erreicht wurde. Bei diesem Verhältnis wurden mit dem Antikörper bCD33 79 % der Tumorzellen eliminiert, beim Kontrollantikörper 0 % und ohne Antikörper fand eine negative Lyse im Sinne einer Proliferation statt. Mit dieser E:T wurden alle weiteren Versuche der HL-60-Zelllinie durchgeführt.

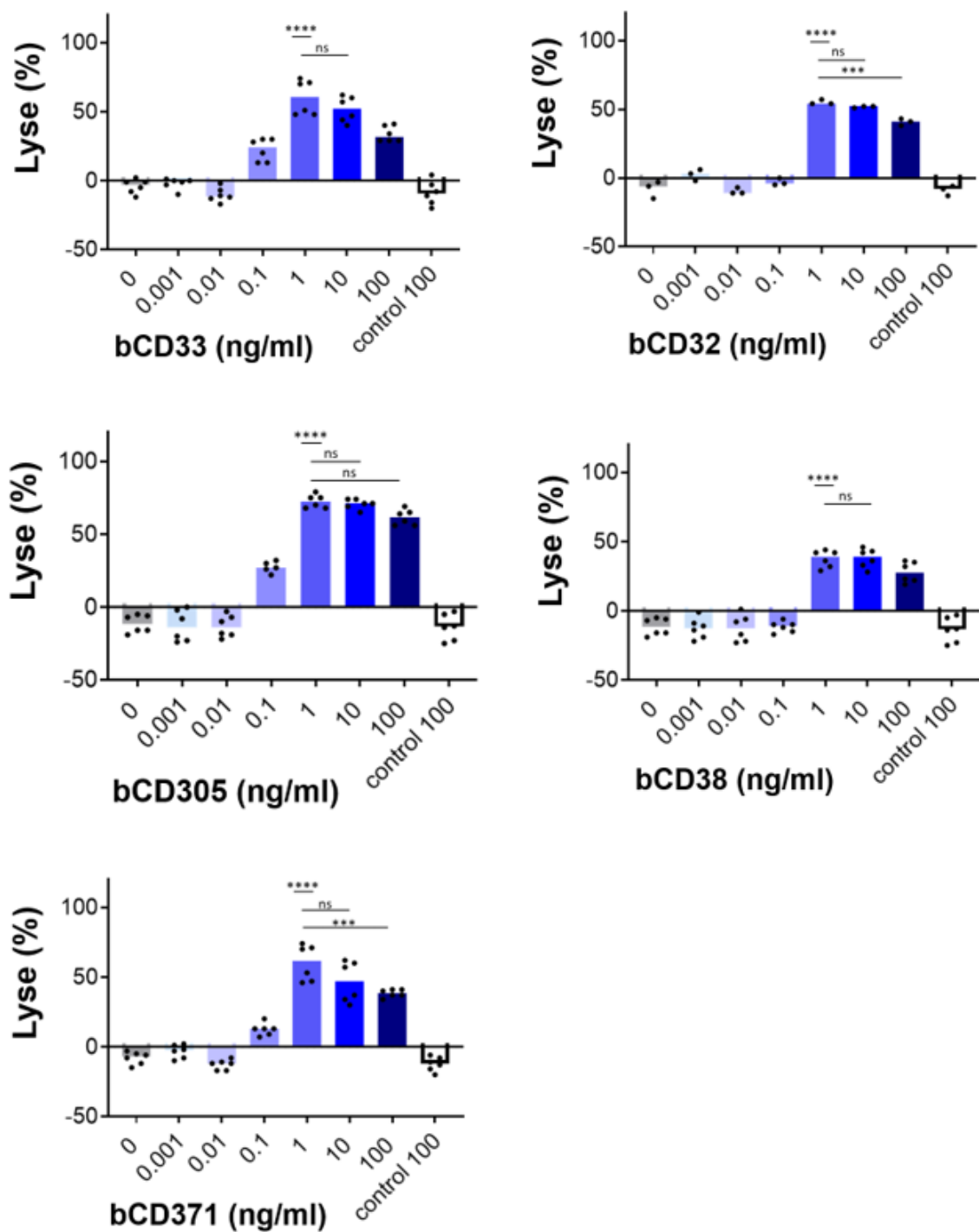
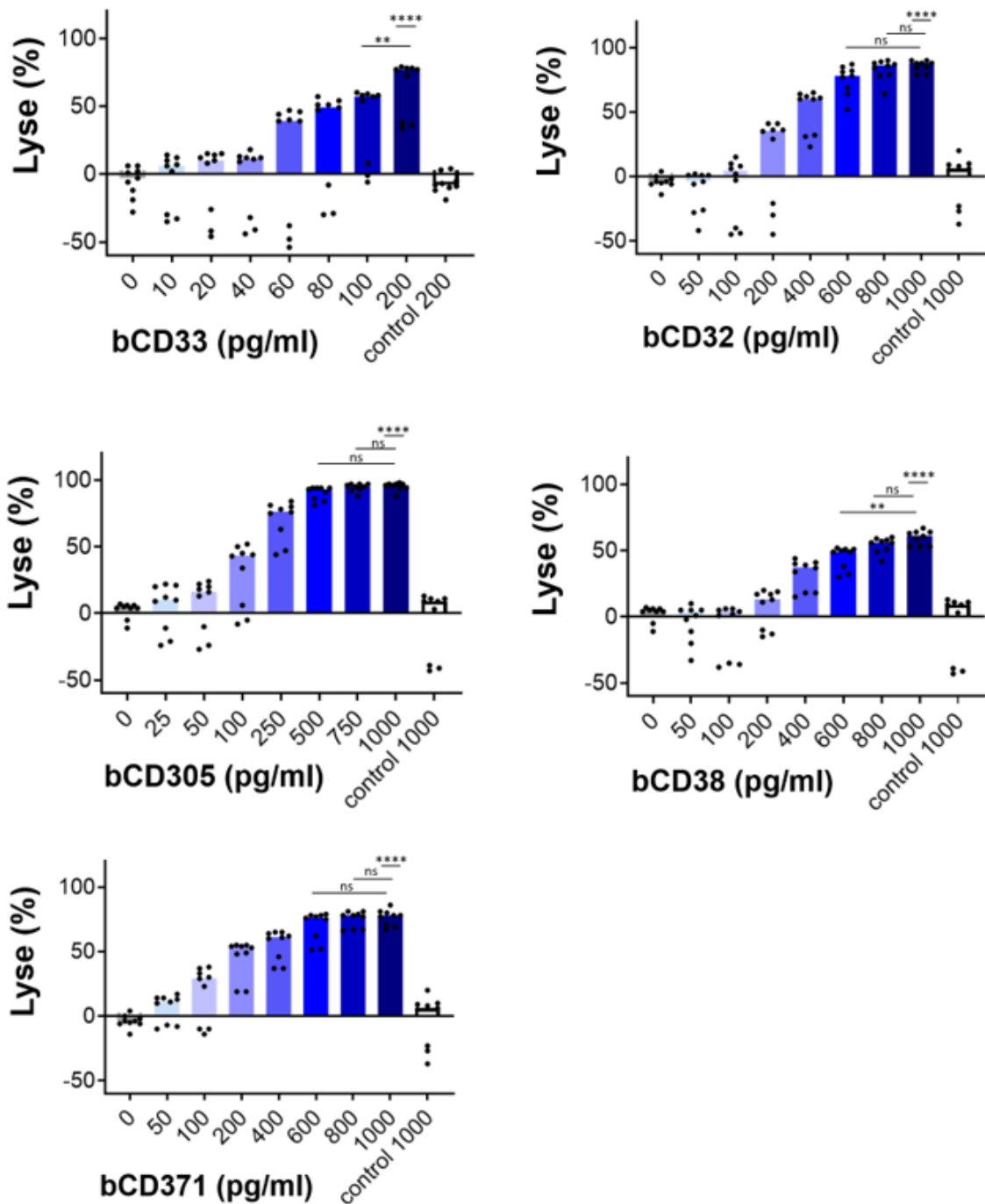
4.1.2. *Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)*

Abbildung 15: HL-60 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen HL-60-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bmAb-control von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate $n = 6$, Versuche $n = 2$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der groben Antikörpertitration der HL-60-Zelllinie. Hierbei wurden die Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD371 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay inkubiert. Jeder Antikörper wurde in den Konzentrationen 0,001 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Bei der verwendeten E:T von 1:1 lag die Inkubationszeit bei 24 Stunden.

Je nach Antikörper lag dieser Umschlagspunkt im Bereich zwischen 0,1 ng/ml und 0,001 ng/ml. Um die genauere Schwellendosis, ab welcher eine spezifische Lyse objektivierbar war, noch genauer zu definieren, fand im nächsten Schritt eine noch feinere Titration statt.

4.1.3. Antikörpertitration (10 pg/ml – 1000 pg/ml)**Abbildung 16: HL-60 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 1000 pg/ml**

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen HL-60-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bmAb-control von 0 pg/ml bis 200 pg/ml bzw. 1000 pg/ml nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate n = 9, Versuche n = 3, biologische Varianz n = 1, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Bei der in Abbildung 16 dargestellten feineren Antikörpertitration konnte nun die subtherapeutische Schwellendosis genauer bestimmt werden. Hierzu wurden die HL-60-Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD371 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay nun in kleineren Schritten inkubiert. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 pg/ml bis 1000 pg/ml in unterschiedlichen Abständen titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Verwendet wurde wieder eine E:T von 1:1 und eine Inkubationszeit von 24 Stunden.

Bei bCD33 wurden 40 pg/ml ausgewählt, bei denen keine Lyse, sondern eine Proliferation von 14 % stattfand, bei bCD38 100 pg/ml (28 %) und bei bCD32 100 pg/ml (30%). Für bCD305 wurden 50 pg/ml gewählt, wobei eine Lyse von 18 % erreicht wurde und bei bCD371 50 pg/ml (18 % Lyse).

4.1.4. Antikörperkombination

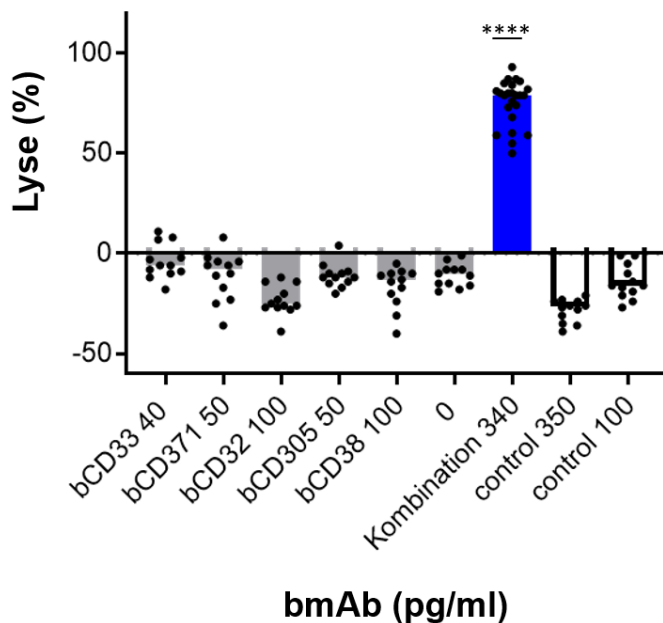


Abbildung 17: HL-60 Antikörperkombination

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörperkombination der AdCAR-T-Zellen gegen HL-60-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32 (100 pg/ml), bCD33 (40 pg/ml), bCD38 (100 pg/ml), bCD305 (50 pg/ml), bCD371 (50 pg/ml) und einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 100 pg/ml und 350 pg/ml) einzeln und in Kombination miteinander nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate Antikörper $n = 12$ und Kombination $n = 24$, Versuche $n = 4$, biologische Varianz $n = 3$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Es erfolgte eine Kombinationstestung der verschiedenen Antikörper mit der zuvor identifizierten jeweiligen subtherapeutischen Schwellendosis. Verwendet wurde eine E:T von 1:1 und eine Inkubationszeit von 24 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

bCD33 in der Konzentration 40 pg/ml führte zu einer negativen Lyse im Sinne einer Proliferation der Targetzellen um 4 %, bCD371 um 11 %, bCD32 um 24 %, bCD305 um 11 % und bCD38 um 17 %. Addiert ergäbe dies insgesamt eine Proliferation um 67 %. Die Kombination aus allen 5 Antikörpern mit jeweiliger Dosis erreichte eine Lyse von 74 %. Der Kontrollantikörper bmAb-control erzeugte im Kontrast dazu eine Proliferation der Targetzellen um 24 %. Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar ($p < 0,0001$).

4.2. U-937

4.2.1. *E:T-Titration*

Bei der Effektor-Target-Titration der Zelllinie U-937 wurden drei verschiedene Konditionen miteinander verglichen. Ziel war es, die beste E:T Ratio für die Antikörper-Titration zu eruieren. Als Adapter wurden der biotinylierte Antikörper bCD33 und der biotinylierte Kontrollantikörper bmAb-control verwendet. Es wurde geprüft, bei welcher E:T eine zuverlässige Lyse >50 % und gleichzeitig eine möglichst geringe unspezifische Lyse ohne Antikörper bzw. mit Kontrollantikörper stattfindet. Vor der Messung mit einem Luminometer wurden die Zellen 24 h inkubiert. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieser Messung.

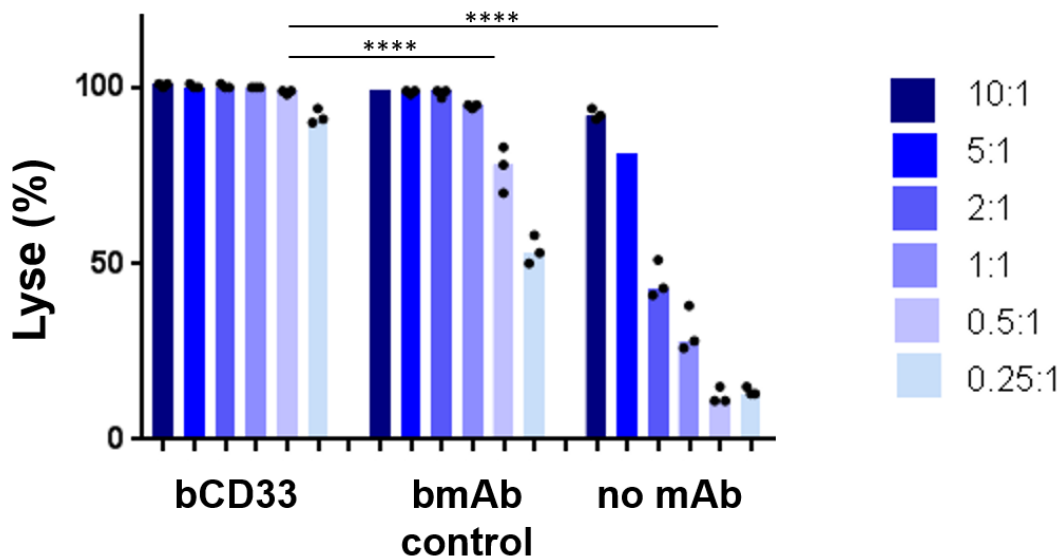


Abbildung 18: U-937 E:T-Titration

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Effektor-Target-Titration von AdCAR-T-Zellen gegen U-937-Leukämiezellen mit dem biotinylierten Antikörper CD33 (bCD33, 10 ng/ml), einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 10 ng/ml) und ohne Antikörper (no mAb) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Technische Replikate $n = 3$, Versuche $n = 1$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey, Signifikanz der Ziel-E:T (0,5:1) markiert.

Im Fall der U-937 wurde eine E:T von 0,5:1 festgelegt, wobei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) erreicht wurde. Bei diesem Verhältnis wurden mit dem Antikörper bCD33 99 % der Tumorzellen eliminiert, beim Kontrollantikörper 77 % und ohne Antikörper 12 %. Mit dieser E:T wurden alle weiteren Versuche der U-937-Zelllinie durchgeführt.

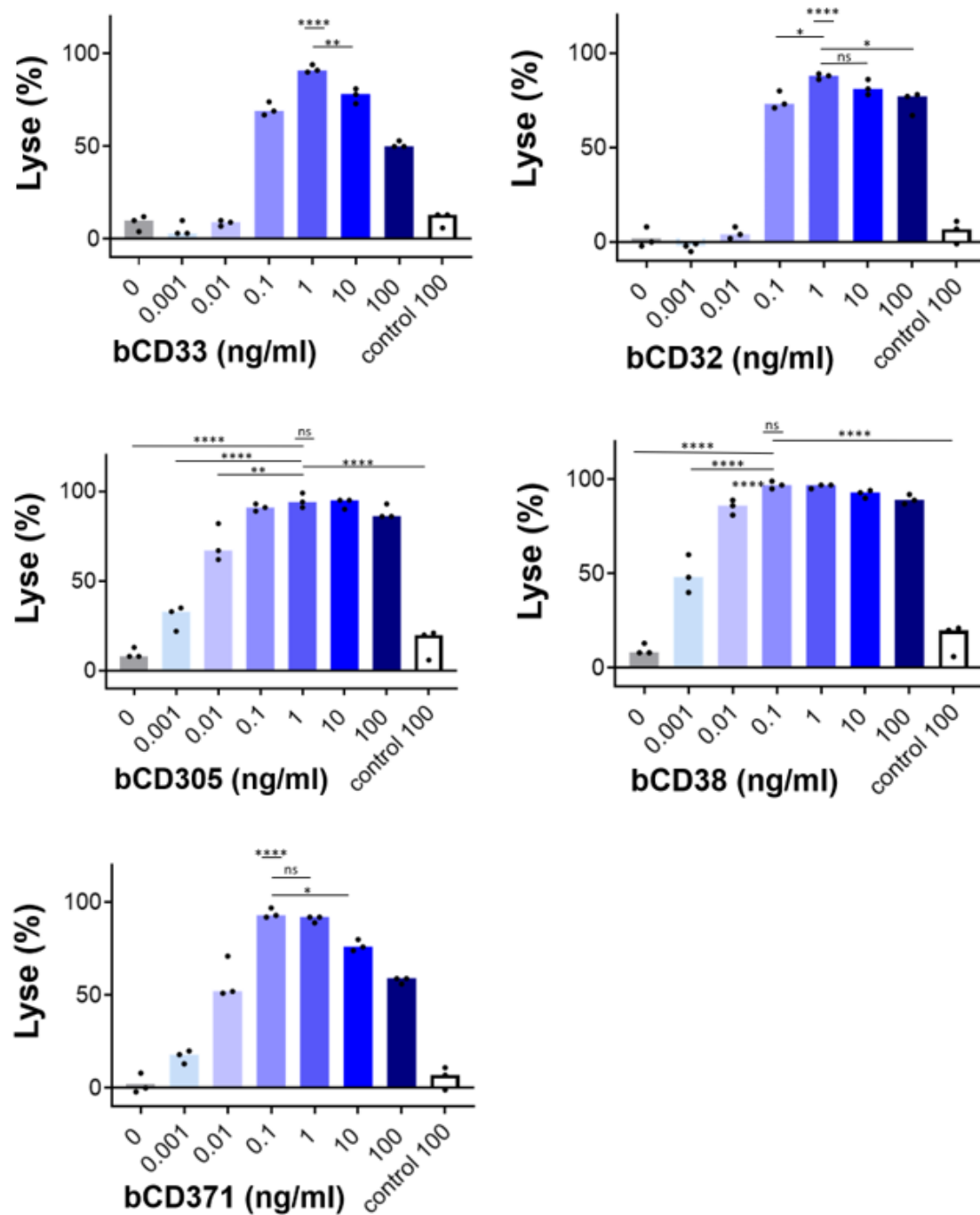
4.2.2. Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)

Abbildung 19: U-937 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen U-937-Leukämiezellen im Verhältnis 0,5:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bmAb-control von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate $n = 3$, Versuche $n = 1$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der groben Antikörpertitration der U-937-Zelllinie. Hierbei wurden die Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD371 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay inkubiert. Jeder Antikörper wurde in den Konzentrationen 0,001 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Bei der verwendeten E:T von 0,5:1 lag die Inkubationszeit bei 24 Stunden.

Je nach Antikörper lag dieser Umschlagspunkt im Bereich zwischen 0,1 ng/ml und 0,001 ng/ml. Um die genauere Schwellendosis, ab welcher eine spezifische Lyse objektivierbar war, noch genauer zu definieren, fand im nächsten Schritt eine noch feinere Titration statt.

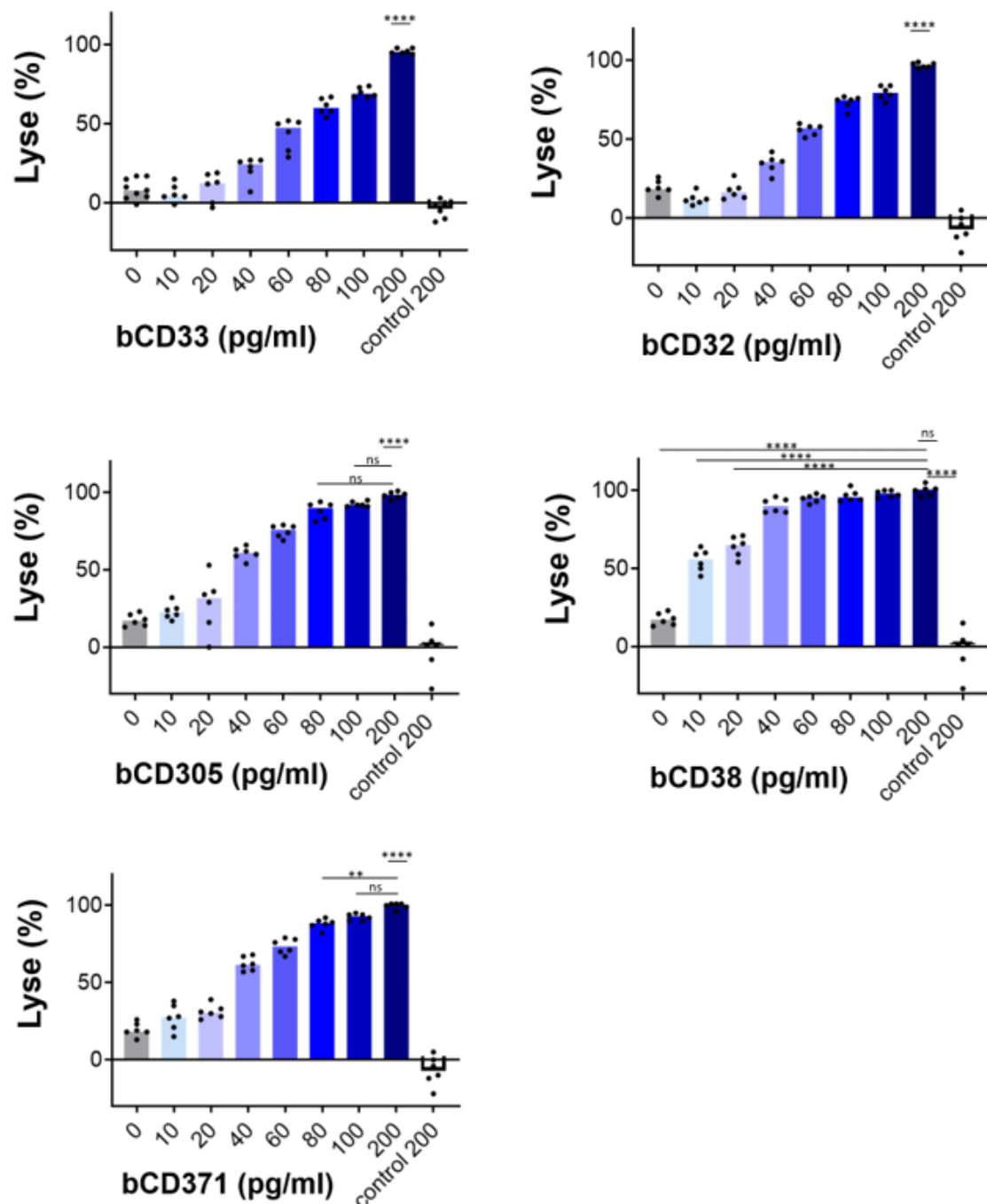
4.2.3. Antikörpertitration (10 pg/ml – 200 pg/ml)

Abbildung 20: U-937 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 200 pg/ml

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen U-937-Leukämiezellen im Verhältnis 0,5:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bmAb-control von 10 pg/ml bis 200 pg/ml nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate n = 6, Versuche n = 2, biologische Varianz n = 1, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Bei der in Abbildung 20 dargestellten feineren Antikörpertitration konnte nun die subtherapeutische Schwellendosis genauer bestimmt werden. Hierzu wurden die U-937-Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD371 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay nun in kleineren Schritten inkubiert. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 pg/ml bis 200 pg/ml titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Verwendet wurde wieder eine E:T von 0,5:1 und eine Inkubationszeit von 24 Stunden.

Da die U937-Zelllinie wesentlich höhere Lysewerte als die anderen Leukämiezelllinien aufwies, wurde für die nachfolgende Kombination eine Konzentration von 10 pg/ml pro Antikörper festgelegt.

Hierbei ist bei bCD33 eine Lyse von 5 %, bei bCD38 49 %, bei bCD305 30% und bCD371 17 % der Targetzellen erkennbar. Bei bCD32 kam es zu einer negativen Lyse im Sinne einer Proliferation um 2%.

4.2.4. Antikörperkombination

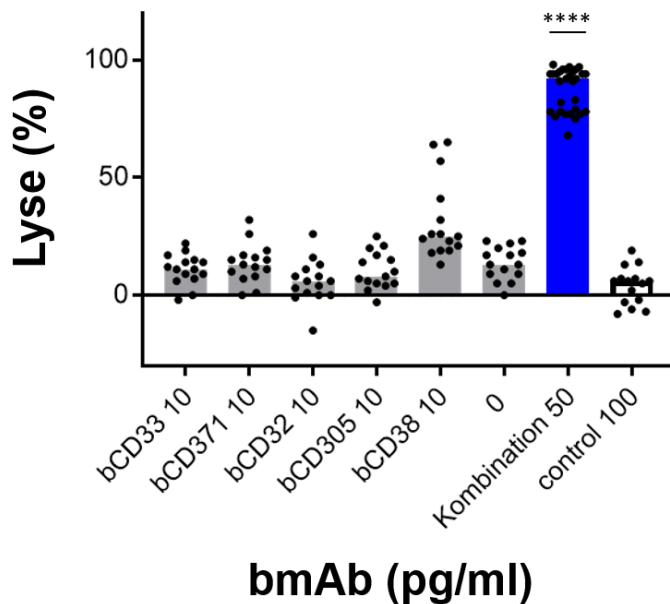


Abbildung 21: U-937 Antikörperkombination

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörperkombination der AdCAR-T-Zellen gegen U-937-Leukämiezellen im Verhältnis 0,5:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD305, bCD371 (je 10 pg/ml) und einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 100 pg/ml) einzeln und in Kombination miteinander nach einer Inkubationszeit von 24h. Technische Replikate Antikörper $n = 15$ und Kombination $n = 30$, Versuche $n = 5$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Es erfolgte eine Kombinationstestung der verschiedenen Antikörper mit der zuvor identifizierten jeweiligen subtherapeutischen Schwellendosis. Verwendet wurde eine E:T von 0,5:1 und eine Inkubationszeit von 24 Stunden. Die einzelnen Antikörper wurden jeweils mit einer Konzentration von 10 pg/ml titriert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Der Antikörper bCD33 lysierte 10 % der Targetzellen, bCD371 11 %, bCD32 3 %, bCD305 9 % und bCD38 24 %. Addiert ergäbe dies eine Lyse von 57 %.

Die Kombination aus allen 5 Antikörpern mit jeweils 10 pg/ml erreichte eine Lyse von 87 %. Der Kontrollantikörper mAb-control erzeugte keine Lyse, sondern eine Proliferation um 11 %. Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar ($p < 0,0001$).

4.3. MOLM-13

4.3.1. E:T-Titration

Bei der E:T-Titration der Zelllinie MOLM-13 wurden drei verschiedene Konditionen miteinander verglichen. Ziel war es, die beste E:T Ratio für die Antikörper-Titration zu eruieren. Als Adapter wurden der biotinylierte Antikörper bCD33 und der biotinylierte Kontrollantikörper bmAb-control verwendet. Es wurde geprüft, bei welcher E:T eine zuverlässige Lyse >50 % und gleichzeitig eine möglichst geringe unspezifische Lyse ohne Antikörper bzw. mit Kontrollantikörper stattfindet. Vor der Messung mit einem Luminometer wurden die Zellen 48 h inkubiert. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse dieser Messung.

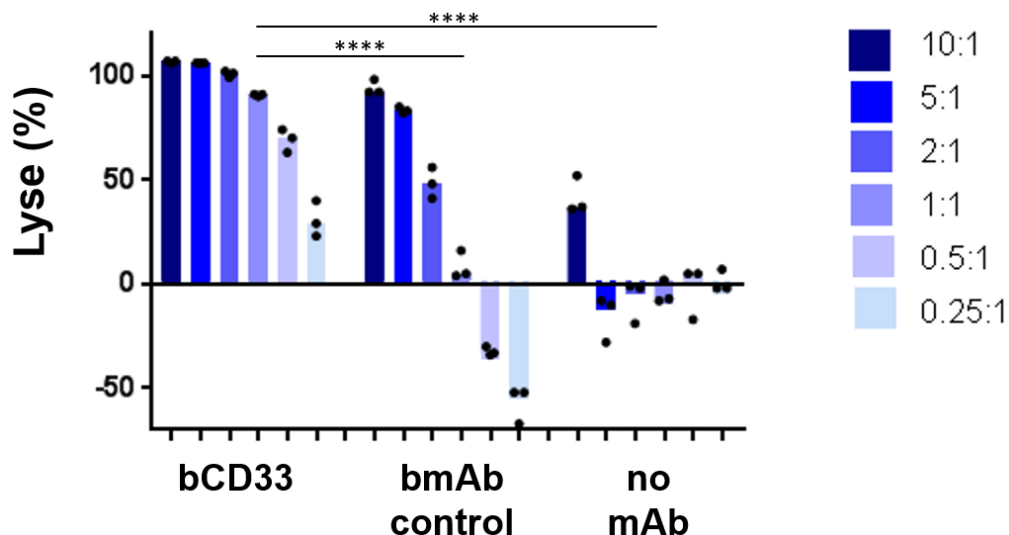


Abbildung 22: MOLM-13 E:T-Titration

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Effektor-Target-Titration von AdCAR-T-Zellen gegen MOLM-13-Leukämiezellen mit dem biotinylierten Antikörper CD33 (bCD33, 10 ng/ml), einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 10 ng/ml) und ohne Antikörper (no mAb) nach einer Inkubationszeit von 48 h. Technische Replikate $n = 3$, Versuche $n = 1$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey, Signifikanz der Ziel-E:T (1:1) markiert.

Im Fall der MOLM-13 wurde eine E:T von 1:1 verwendet, wobei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) erreicht wurde. Bei diesem Verhältnis wurden mit bCD33 91 % der Tumorzellen eliminiert, beim Kontrollantikörper nur 8 % und ohne Antikörper fand eine negative Lyse im Sinne einer Proliferation von 4 % statt. Mit dieser E:T wurden alle weiteren Versuche mit der MOLM-13-Zelllinie durchgeführt.

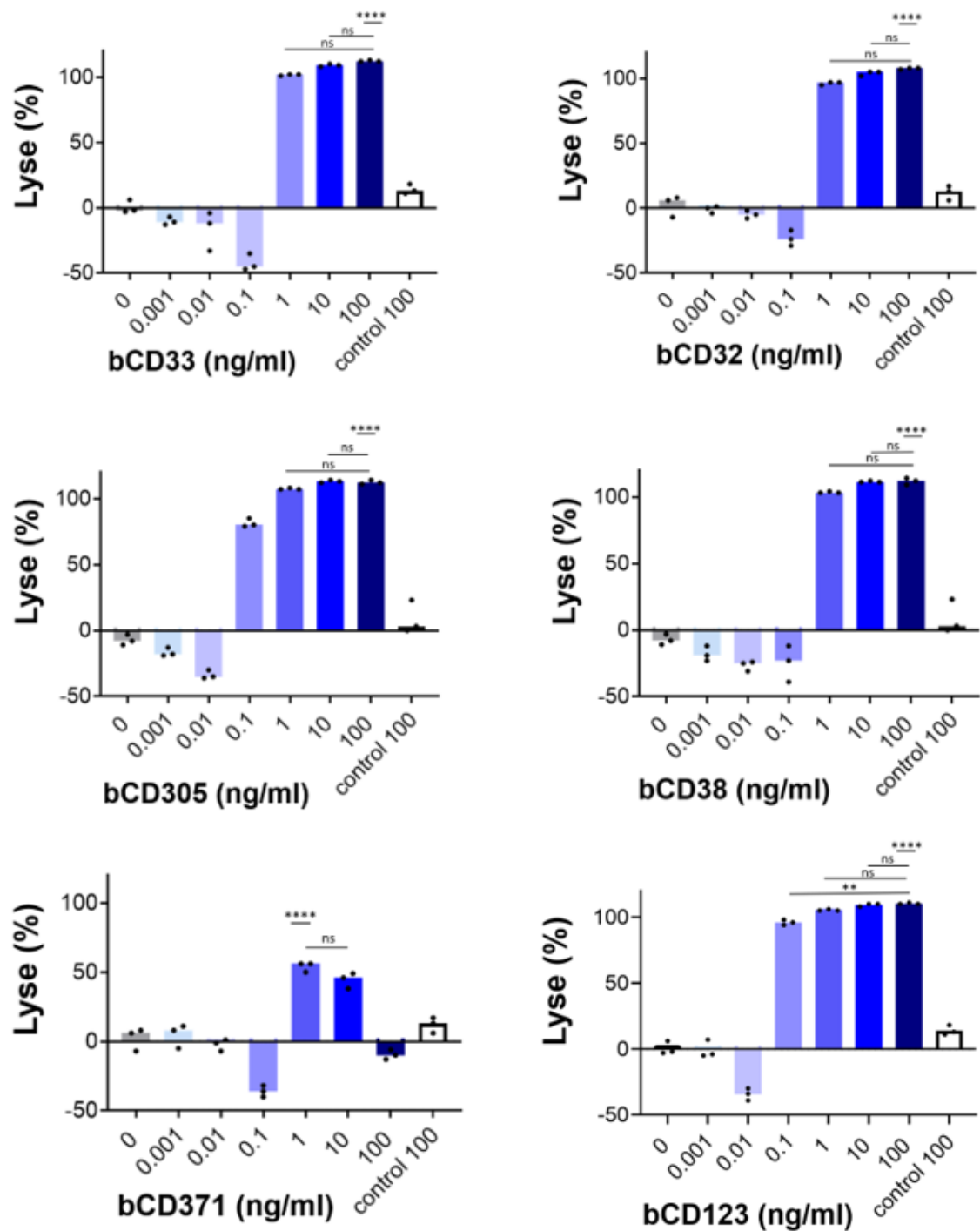
4.3.2. Antikörpertitration (0,001 ng/ml – 100 ng/ml)

Abbildung 23: MOLM-13 Antikörpertitration von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen MOLM-13-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bMAb-control von 0,001 ng/ml bis 100 ng/ml nach einer Inkubationszeit von 48 h. Technische Replikate $n = 3$, Versuche $n = 1$, biologische Varianz $n = 1$, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der groben Antikörpertitration der MOLM-13-Zelllinie. Hierbei wurden die Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD371 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay inkubiert. Jeder Antikörper wurde in den Konzentrationen 0,001 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Bei der verwendeten E:T von 1:1 lag die Inkubationszeit bei 48 Stunden.

Je nach Antikörper lag dieser Umschlagspunkt im Bereich zwischen 0,1 ng/ml und 0,001 ng/ml. Um die genauere Schwellendosis, ab welcher eine spezifische Lyse objektivierbar war, noch genauer zu definieren, fand im nächsten Schritt eine noch feinere Titration statt.

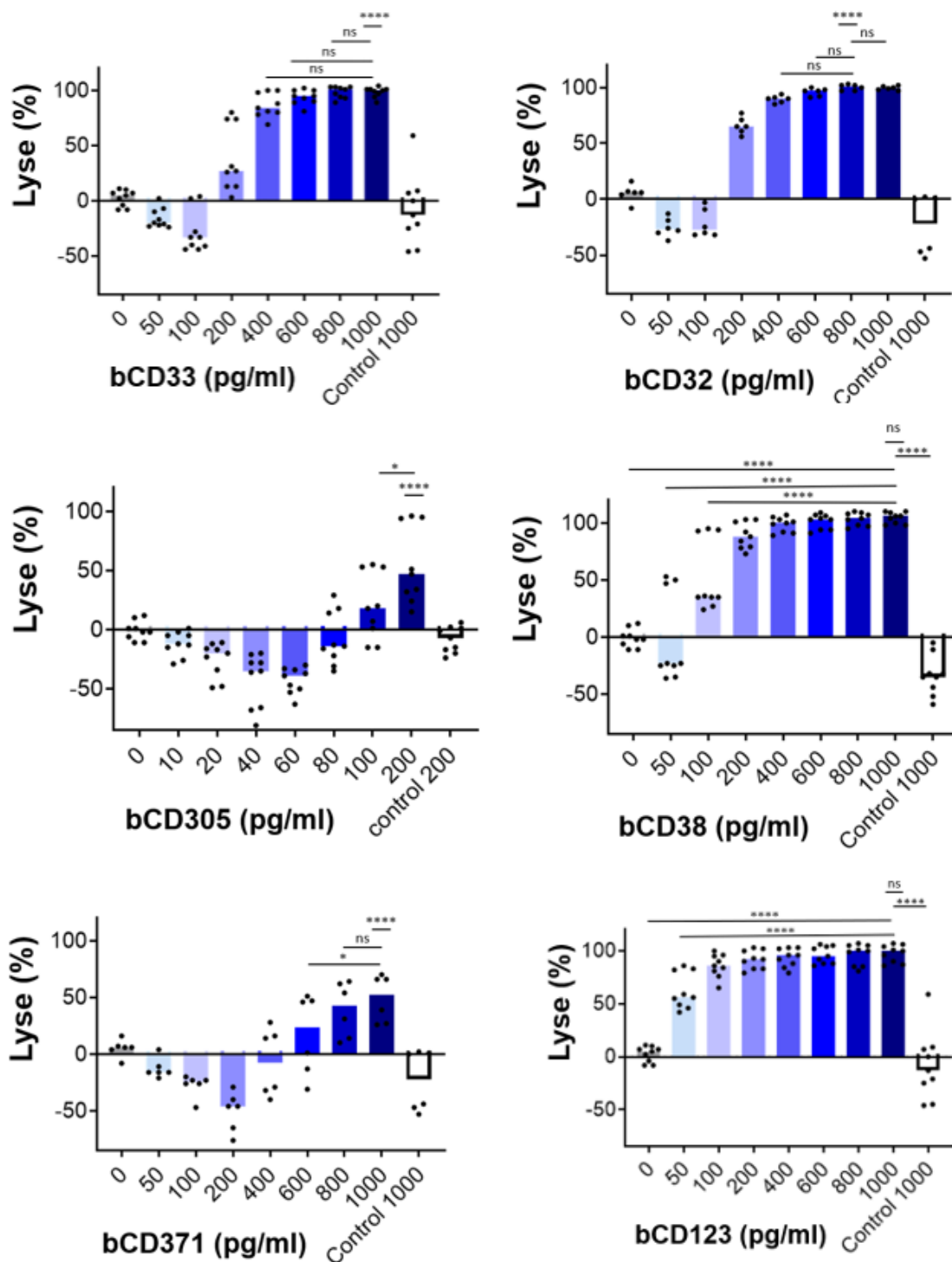
4.3.3. *Antikörpertitration (10 pg/ml – 1000 pg/ml)*

Abbildung 24: MOLM-13 Antikörpertitration von 10 pg/ml bis 1000 pg/ml

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörpertitration der AdCAR-T-Zellen gegen MOLM-13-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305, bCD371 und einem biotinylierten Kontrollantikörper bmAb-control von 0 pg/ml bis 200 bzw. 1000 pg/ml nach einer Inkubationszeit von 48h. Technische Replikate n = 9, Versuche n = 3, biologische Varianz n = 1, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Bei der in Abbildung 24 dargestellten feineren Antikörpertitration konnte nun die subtherapeutische Schwellendosis genauer bestimmt werden. Hierzu wurden die MOLM-13-Leukämiezellen mit den Antikörpern bCD33, bCD32, bCD38, bCD305 und bCD123 und bmAb-control in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitäts-Assay nun in kleineren Schritten inkubiert. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 pg/ml bis 200 pg/ml bzw. bis 1000 pg/ml titriert, um den Bereich einzugrenzen, in dem der Umschlag zwischen Zytolyse und Proliferation stattfindet. Verwendet wurde wieder eine E:T von 1:1 und eine Inkubationszeit von 48 Stunden.

Bei den Antikörpern bCD33, bCD32 und bCD38 zeigte sich bei einer Antikörperkonzentration von 200 pg/ml eine deutliche Lyse, bei bCD123 schon bei 50 pg/ml und bei bCD305 und bCd371 erst bei deutlich höheren Werten. bCD371 wurde aufgrund der geringen Lysewerte und Expression (S. Tabelle 8, Seite 49) nicht für die 5-fach-Kombination verwendet.

Bei der Auswahl der Antikörperkonzentration zur Durchführung der MOLM-13-Kombination wurde ein anderer Ansatz als bei den anderen Tumorzelllinien verwendet. Es wurde zur Kombination von jedem Antikörper dieselbe Konzentration benutzt. Der Hintergrund dieser einheitlichen Konzentrationsauswahl bestand in der einfacheren Durchführung der Assays in Bezug auf eine zukünftige klinische Anwendbarkeit. Pipettiert wurden die Antikörper jeweils mit 10 pg/ml, 20 pg/ml, 50 pg/ml und 100 pg/ml. Die Ergebnisse der besten Kombination (Je 20 pg/ml) werden im nächsten Schritt dargestellt.

4.3.4. Antikörperkombination

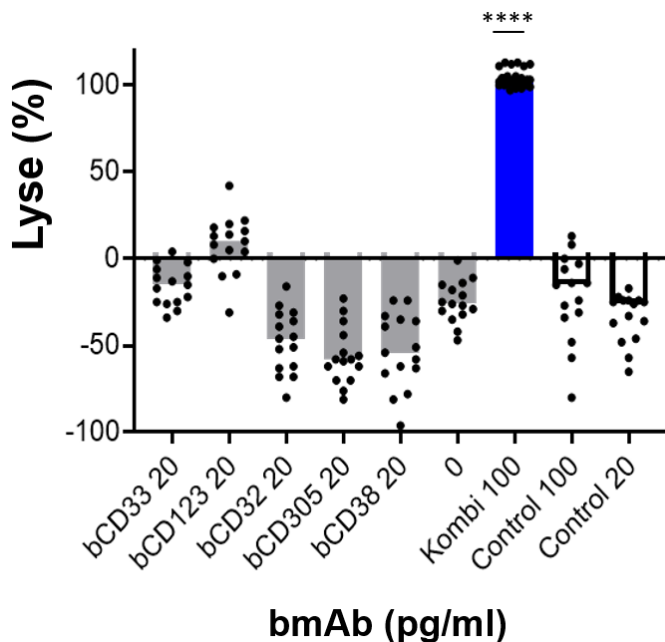


Abbildung 25: MOLM-13 Antikörperkombination

Luciferase-basierter Zytotoxizitätsassay: Antikörperkombination der AdCAR-T-Zellen gegen MOLM-13-Leukämiezellen im Verhältnis 1:1 mit den biotinylierten Antikörpern bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305 (je 20 pg/ml) und einem biotinylierten Kontrollantikörper (bmAb-control, 20 pg/ml und 100 pg/ml) einzeln und in Kombination miteinander nach einer Inkubationszeit von 48 h. Technische Replikate Antikörper n = 15 und Kombination n = 30, Versuche n = 5, biologische Varianz n = 1, One-Way ANOVA und post-hoc Test Tukey.

Es erfolgte eine Kombinationstestung der verschiedenen Antikörper. Verwendet wurde eine E:T von 1:1 und eine Inkubationszeit von 48 Stunden. Pipettiert wurden die Kombinationsansätze jeweils mit 10 pg/ml, 20 pg/ml, 50 pg/ml und 100 pg/ml. Die Ergebnisse der besten Kombination (Je 20 pg/ml) werden in Abbildung 25 dargestellt.

Der Antikörper bCD123 lysierte 8 % der Targetzellen. Bei den Anderen Antikörpern fand eine Proliferation statt: Bei bCD33 um 16 %, bCD32 um 47 %, bCD305 56 % und bei bCD38 53 %. Addiert ergäbe dies eine Proliferation um 164 %. Die Kombination aus allen 5 Antikörpern mit einer Konzentration von jeweils 20 pg/ml erreichte eine Lyse von 104 %. Der Kontrollantikörper erzeugte keine Lyse, sondern eine Proliferation um 22 %. Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar ($p < 0,0001$).

IV. Diskussion

Neuartige, flexible CAR-Technologien werden zukünftig in der Therapie unterschiedlicher Tumorerkrankungen immer häufiger Anwendung finden. Besonders die AML stellt die Kliniker bislang aufgrund ihrer biologischen Merkmale und der daraus resultierenden therapeutischen Limitationen vor eine große Herausforderung. Die schwerwiegenden Nebenwirkungen der myeloischen Ablation und die Heterogenität der AML im Hinblick auf eine mögliche Immunevasion erfordern ein sicheres, flexibles, an- und abschaltbares System, mit dem durch multiples, synchrones Immunotargeting die AML in der Gesamtheit erreicht werden kann. Zu diesen neuartigen Technologien gehören die AdCAR-T-Zellen. In Verbindung mit dem Prinzip der Surface Activation Matrix wird ein neuartiges Konzept der Immuntherapie geschaffen, das in der vorliegenden Arbeit *in vitro* an AML-Zellen getestet wurde. Die Relevanz, die Vor- und Nachteile, sowie die Limitationen der AdCAR-Technologie und der SAM bezüglich der AML-Therapie werden im Folgenden im Kontext der experimentell erhobenen Daten kritisch diskutiert.

1. Die Relevanz neuer Therapiestrategien

Obwohl die aktuelle AML-Therapie in Form von Chemotherapien in einigen Fällen vorerst zu einer Elimination der malignen Leukämiezellen führt, ist lediglich bei 30 % der Erkrankten ein langanhaltender Therapieerfolg zu beobachten [96, 97]. Es besteht folglich ein großer medizinischer Bedarf an neuen Therapieregimen, um den Herausforderungen akuter und chronischer Toxizität sowie der Immunevasion zu begegnen. Die zahlreichen aversiven Effekte der Chemotherapeutika, welche häufig emetogen, neurotoxisch, nephrotoxisch oder kardiotoxisch wirken, stellen bislang eine enorme Belastung für den Patienten und eine große Herausforderung für eine erfolgreiche Therapie dar [98-100]. Trotz großer Bemühungen in der Entwicklung neuer Therapieprinzipien wie FLT3-Inhibitoren, STAT-Inhibitoren, monoklonalen Antikörpern oder CAR-T-Zellen, konnten diese die Standardtherapie nur im Einzelfall komplementieren und keinesfalls ersetzen [101, 102]. Ziel aktueller Forschung ist die Etablierung einer neuen, wirksamen und zugleich gut kontrollierbaren Therapiemöglichkeit. Hierbei treten unterschiedliche Ansätze mit CAR-T-Zellen immer mehr in den Vordergrund [19, 63, 103, 104].

Das Potenzial der CAR-T-Zell-Therapie wurde bereits in klinischen Studien zur Therapie der B-ALL verdeutlicht, wo komplette Remissionsraten von 90 % erreicht wurden, was schließlich auch zur Zulassung der CD19-CAR-T-Therapeutika KYMRIAH und YESCARTA durch die FDA führte [105-107]. Obwohl die Behandlung nicht zwischen malignen und gesunden CD19-positiven Zellen unterscheidet, tolerieren die Patienten die Depletion der CD19-positiven Lymphozyten, das heißt der B-Lymphozyten und deren Progenitorzellen [105, 106]. Dies wird unter anderem erreicht, indem deren Funktion teilweise durch die Substitution von Immunglobulinen ersetzt werden kann [108].

Auch zur Therapie der AML werden mittlerweile verschiedene CAR-Systeme in Phase I, II und III Studien untersucht [37]. Klinische Anwendung finden bereits CD33-spezifische CAR-T-Zellen, deren Therapie jedoch bislang mit starken Nebenwirkungen behaftet ist [53, 109]. Im Kontrast zur Depletion CD19-positiver Zellen bei der ALL-Therapie erzeugt die Therapie der AML durch die Depletion der Zellen der myeloischen Reihe, wie z.B. der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, ein breites Feld an Problemen und aversiven Effekten (Vgl. Kapitel I.1.). Hierbei stellt besonders die Neutropenie ein zentrales Problem dar [109]. Aufgrund dessen ist eine gezielte, passende Antigenauswahl für die AML-Therapie von umso größerer Bedeutung.

Trotz jahrelanger Forschung und gezielter Immuntherapie steht die Therapie mit CAR-T-Zellen immer noch vor einigen Herausforderungen. Die CAR-T-Zellen konventioneller CARs werden in den Patienten infundiert, wo sie schließlich dauerhaft und unkontrolliert aktiv sind und ihre lytische Wirkung entfalten. Daraus ergeben sich Risiken wie das lebensbedrohliche Zytokin-Freisetzungssyndrom, die Neurotoxizität und die On-Target-Off-Tumor-Toxizität, welche den therapeutischen Handlungsspielraum erheblich einschränken (Vgl. Kapitel I.4.). Besonders die Unfähigkeit, den Grad und die Geschwindigkeit der Zytokinfreisetzung zu kontrollieren und die daraus resultierenden Nebenwirkungen wie Fieber, Hypoxie, Hypotension, Herz-, Leber- und Nierenversagen führten zur Unterbrechung mehrerer klinischer Studien mit CAR-T-Zellen [110].

Um diesen Nebenwirkungen möglichst zu entgehen, müssen innovative Auswege geschaffen werden. Ein „optimales“ CAR-System sollte kontrollierbar sein, ein flexibles und dauerhaftes Targeting zulassen und selektiv zwischen Tumorzelle und gesunder Zelle unterscheiden können. Neue Strategien sind notwendig, um die CAR-T-Zell-Therapie zu verbessern und eine klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen.

2. Die AdCAR-Technologie im Vergleich

Ein erster wichtiger Schritt stellt die Entwicklung eines funktionsfähigen, potenten und gleichzeitig sicheren CAR-Systems dar. Mit dem hier verwendeten Adapter-CAR-System können Zellen hergestellt werden, die einerseits potent sind und gleichzeitig einen Sicherheitsmechanismus beinhalten [89].

Die Potenz der AdCAR-T-Zellen wird bei der Betrachtung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkonzentrationen deutlich, welche im Picogramm-Bereich lagen (Vgl. III.4.). Diese geringen Konzentrationen erzeugten eine überzeugende Tumorlyse von bis zu 100 % (Vgl. III.4.). Dies impliziert, dass trotz der Zwischenschaltung eines Adaptermoleküls eine potente Effektorfunktion erreicht werden kann. Im Vergleich dazu liegt beispielsweise die angewandte Dosis des monoklonalen CD33-spezifischen Antikörpers Gemtuzumab-Ozogamicin bei 3 mg/m² [111].

Es wird versucht, durch die Zwischenschaltung eines extrazellulären Adaptermoleküls die Target-Antigen-Erkennung und die CAR-T-Zell-Aktivierung voneinander zu trennen und somit einen hohen Grad an Kontrolle zu erreichen. Durch diese Adaptermoleküle, die an Linker-Label-Epitope gekoppelt sind, birgt das System das Potential der An- und Abschaltbarkeit und soll somit die CAR-induzierte Toxizität und folglich die Nebenwirkungen reduzieren. Im Falle eines exzessiven Zytokinsturms oder anderer potenziell tödlicher Nebenwirkungen kann direkt eingegriffen und die Therapie deeskaliert oder sogar unterbrochen werden [89].

Abbildung 27 veranschaulicht die verschiedenen Möglichkeiten zur AdCAR-Erkennung und Aktivierung. Ohne Antikörper, in Anwesenheit eines falschen, nicht passenden Antikörpers oder auch eines passenden, jedoch nicht biotinylierten Antikörpers kann keine Lyse induziert werden. Nur durch Zugabe eines passenden, biotinylierten Antikörpers kann die AdCAR-T-Zelle aktiviert und eine Lyse induziert werden [89].

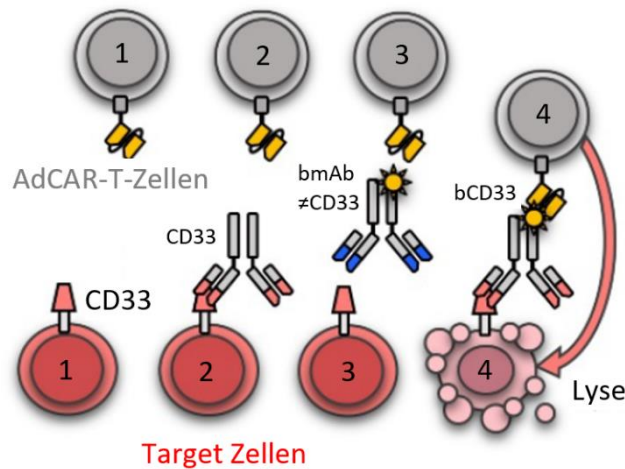


Abbildung 26: AdCAR-Erkennung und Aktivierung

Eine AdCAR-T-Zelle allein induziert keine Lyse der CD33-positiven Tumorzelle (1). In Anwesenheit eines anti-CD33-Antikörpers (2) oder eines biotinylierten, nicht-anti-CD33-Antikörpers (3) findet ebenfalls keine Lyse statt. Nur bei Zugabe eines biotinylierten anti-CD33-Antikörpers (4) kann die AdCAR-T-Zelle aktiviert und eine Lyse induziert werden.

(Grafik adaptiert aus dem Manuskript Seitz ...Kieble... et al. - Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting, in Revision bei Cancer Immunology Research)

CAR-T-Zellen bieten aufgrund ihrer Eigenschaften die Möglichkeit, nach einer Transplantation über Jahre und Jahrzehnte zu persistieren [112-114]. In einer klinischen Studie zur Therapie einer refraktären AML mit CD33-CAR-T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass der CAR-T-Zell-Spiegel *in vivo* sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark über die 60-Tage-Beobachtung hinaus anhaltend hoch blieb [109]. In einer anderen Studie konnten anti-CD19-CAR-T-Zellen noch nach über 2 Jahren im Patienten detektiert werden [114]. Dies birgt einerseits den Vorteil einer Therapiemöglichkeit, die dauerhaft zugänglich ist, ohne ständig erneut Zellen infundieren zu müssen. Andererseits wird aufgrund der Persistenz jedoch das Problem geschaffen, dass die CAR-T-Zellen auch nach der Elimination der Tumorzellen im Körper aktiv sind und weiterhin gesundes Gewebe angreifen, welches die entsprechenden Antigene exprimiert. Aufgrund der Persistenz der Zellen stellen die Nebenwirkungen der CAR-Therapie ein stetiges Problem dar, wodurch die Kontrollierbarkeit, beispielsweise via Adaptermolekülen, eine noch größere Rolle spielt [38].

Das AdCAR-System bietet die Möglichkeit, eine sowohl dauerhafte als auch kontrollierbare Therapie zu erreichen [89]. In Abwesenheit des Adapters, im Falle der AdCARs des jeweiligen biotinylierten Antikörpers, fungieren die AdCAR-T-Zellen als normale T-Zellen ohne lytische Aktivität und lassen somit gesundes Gewebe unbeeinträchtigt [89]. Die Lyse wird erst durch Zugabe des Adapters induziert [89]. Die Antikörper werden nach ihrer entsprechenden Halbwertszeit vom Körper abgebaut und somit wird die AdCAR-Aktivität ebenfalls gestoppt [89]. Treten dennoch lebensbedrohliche Nebenwirkungen auf, können die AdCAR-T-Zellen durch Absättigung von Antikörpern ohne LLE abgeschaltet werden [89]. Somit kann das AdCAR-System im Vergleich zu den konventionellen CAR-Systemen dabei helfen, einen toxischen, potenziell tödlichen Verlauf abzuwenden.

LLE-mAbs lassen sich leicht unter GMP-Bedingungen herstellen, wodurch im Vergleich zu anderen komplexeren Adaptermolekülen [89, 115, 116] eine leichtere, ökonomisch relevante Translation in die Klinik ermöglicht wird [89]. Es wird bei Verwendung handelsüblicher AMs eine Therapie entsprechend des individuellen Tumorantigenexpressionsprofils ermöglicht. Das AdCAR-System ermöglicht die Verwendung einer Vielzahl unterschiedlicher AM-Formate (mAb, mAb-Fragmente, Fab2, single domain, scFv und andere) und bietet somit eine Varianz in den Bereichen Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Biostabilität und Tumorpenetration [89, 117]. Durch das Targeting unterschiedlicher AMs wird eine gewisse Vielseitigkeit erreicht trotz Verwendung eines einzigen CAR-Konstrukts. Dies schafft wiederum einen flexibleren Handlungsspielraum.

Mit den herkömmlichen CAR-Systemen war es bislang nur möglich, zwei Antigene gleichzeitig zu erkennen. Das AdCAR-System kann durch die einfache Integration von LLE-Signalen auf AMs auf verschiedene Antigene gleichzeitig abzielen. Hierdurch wird die Fähigkeit geschaffen, die Tumorzellen gezielt durch Integration unterschiedlicher Expressionsmuster zu erkennen und zu lysieren (SAM, Vgl. III.4). Unter Anwendung dieses Poly-Targeting-Ansatzes könnte es das CAR-System ermöglichen, die AdCAR-Aktivität auf den Tumor zu fokussieren und die zytotoxische Wirkung auf gesundes Gewebe zu reduzieren, welches nur einen Bruchteil der genutzten Antigene coexprimiert.

Auch andere Arbeitsgruppen haben sich mit der Entwicklung eines passenden Adaptermoleküls beschäftigt. Ma et al beschrieben das Adaptersystem der sCAR-T-Zellen, das sich durch die „switch“-Moleküle anti-CD19 und anti-CD20 Antikörperfragmente auszeichnen, die unter Verwendung genetisch codierter Aminosäuren ortsspezifisch mit FITC modifiziert wurden [115]. Auch Lee et al konstruierten ein neuartiges scFv, das Fluorescein binden kann [118]. Nur in Anwesenheit eines bispezifischen Antikörpers, der einerseits die Tumorzelle und andererseits über eine Fluorescein-Folat-Brücke die CAR-T-Zelle bindet, kann das CAR aktiviert werden. Ein potenzielles Problem hierbei ist der künstlich hergestellte Fluoreszenzfarbstoff FITC, welcher vom menschlichen Körper als fremd erkannt werden kann und somit ein hohes Abstoßungspotenzial bietet.

Eine andere Arbeitsgruppe stellte die anti-tag CARs (AT-CARs) her. Sie wurden unter Verwendung der affinitätsverstärkten monomeren Streptavidin 2 (mSA2)-Biotin-Bindungsdomäne entwickelt [119]. Auch hier wurden biotinylierten Antikörper verwendet. Bei Streptavidin handelt es sich um ein Protein, das von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziert wird und folglich sehr immunogen ist und ebenfalls hohes Abstoßungspotential besitzt. Ebenfalls kritisch ist die hohe Affinität des Streptavidin zu natürlich vorkommendem Biotin, woraus eine Absättigung und somit einen Wirkverlust resultieren kann. Im Vergleich hierzu konnten bei den in dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen, deren scFv, d.h. Bindungsdomäne abgeleitet von dem monoklonalen Antikörperklon mBio3, keine Wechselwirkungen mit freiem, physiologisch vorhandenen Biotin gefunden werden [89].

Bachmann stellte das System der UniCARs (universal CARs) vor [120]. Ähnlich wie beim AdCAR-System wird hier ein Molekül zwischengeschaltet, um ein Maß an Regulation zu schaffen. Das zwischengeschaltete Molekül ist ein Peptid-Epitop, welches eine Verbindung zwischen UniCAR und Antigen der Zielzelle herstellt [120]. Durch gleichzeitiges Targeting von UniCARs gegen CD33 und CD123 konnte eine effiziente Lyse der AML-Zellreihe MOLM13 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erreicht werden [103].

In den letzten Jahren weckten bispezifische Antikörper das Interesse der Forscher. Hierunter versteht man Antikörper bzw. Antikörperfragmente mit zwei Antigenbindungsdomänen, die gleichzeitig gebunden werden können [121, 122]. Für die Tumortherapie von besonderer Bedeutung sind hierbei jene, die einerseits ein tumorassoziiertes Antigen und andererseits ein lymphozytenassoziiertes Antigen, beispielsweise CD3, binden [122]. Diese bispezifischen T-Zell-Antikörper werden auch BiTE (engl. bispecific T-cell engagers) genannt. BiTE-Antikörper sind künstlich hergestellte, monoklonale Antikörper, die eine Verbindung zwischen Tumorzelle und T-Zelle herstellen [123, 124]. Die T-Zelle wird somit aktiviert und konsekutiv eine Immunreaktion ausgelöst, wodurch die Tumorzelle durch Mitwirkung von Perforin und Granzym lysiert wird [85, 125]. Diese Wirkweise wird ebenfalls bei den CAR-T-Zellen genutzt. In Deutschland wurde 2015 Blinatumomab, der gegen CD3 und CD19 gerichtet ist, als erster BiTE-Antikörper zur Therapie bestimmter ALL-Formen zugelassen [123]. Andere Antikörper zur Therapie des multiplen Myeloms und solider Tumoren werden aktuell genauer untersucht [126-128]. Auch zur Therapie der AML werden BiTEs erforscht, die neben CD3 auf CD33 abzielen [129]. Bispezifische Antikörper können im Vergleich zu AdCAR-T-Zellen, die individuell auf den Patienten angepasst werden, leichter und universell für alle Patienten gleichermaßen hergestellt werden, was kostentechnisch von Vorteil sein kann. Klinisch ist jedoch eine wiederholte Gabe nötig. AdCAR-T-Zellen können dagegen persistieren, weshalb lediglich das Adaptermolekül, nicht jedoch die AdCAR-T-Zelle erneut hergestellt und infundiert werden muss [85]. Außerdem wird für die Anwendung der BiTEs keine Lymphozytendepletion benötigt [85]. Problematisch gestaltet sich jedoch die unspezifische Aktivierung der T-Zellen auch unabhängig von Bindung einer zweiten Zielzelle bzw. Tumorzelle [130]. Die dadurch hervorgerufene überschießende Immunreaktion ist mitunter ursächlich für die Toxizität der BiTEs [130]. Im Vergleich dazu sind AdCARs spezifischer, indem sie nur dann eine Reaktion hervor, wenn sie auf einen passenden Adapter und ein tumorassoziiertes Antigen treffen [89]. Ansonsten fungieren sie als normale T-Zellen. Als gemeinsame Herausforderungen der CARs und BiTEs wird daran gearbeitet, die aversiven

Effekte wie das CRS und die Neurotoxizität zu minimieren oder gar beseitigen [85]. Der Vorrat an BiTEs ist im Vergleich zu den AdCARs schneller erschöpft, da diese nicht über den CD3-Komplex vermittelt werden, sondern über einen artifiziellen TCR mit costimulatorischen Einheiten. Hierbei dient besonders CD137, auch 4-1BB genannt, nicht nur zur Co-Stimulation und Zytokin-Induktion, sondern es wird auch ein starkes Überlebenssignal kreiert, das die T-Zellen langsamer differenzieren lässt und somit einer Exhaustion (engl. Erschöpfung) entgegenwirkt [131, 132].

Eine weitere nennenswerte Technologie im Rahmen der Immuntherapie stellen die CAR-NK-Zellen (chimeric antigen receptor natural killer cells) dar. Analog zu den T-Zellen können auch NK-Zellen mit einem CAR-Rezeptor ausgestattet werden. CD123-spezifische Killer-Zellen wurden bereits zur Therapie der AML entworfen und zeigten eine überzeugende Lyse [133]. CAR-NK-Zellen bieten den Vorteil, in großen Mengen auch von Fremdspendern, also allogenen, zugeführt zu werden, ohne eine relevante GvH-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion) auszulösen [134, 135]. Außerdem produzieren NK-Zellen weniger Zytokine als T-Zellen, wodurch ein CRS seltener bzw. weniger ausgeprägt beobachtet wird [136, 137]. NK-Zellen besitzen eine kürzere Lebensdauer als T-Zellen, wodurch die Therapie zeitlich begrenzt ist [137]. AdCAR-T-Zellen müssen im Vergleich hierzu nur einmal infundiert werden. Die T-Zellen bieten den Vorteil, im Körper stärker zu proliferieren und länger oder gegebenenfalls für immer im menschlichen Körper zu persistieren und somit eine dauerhaftere Therapieform darzustellen [112-114]. Im Falle eines Rezidivs müssten NK-Zellen neu hergestellt und infundiert werden, die CAR-T-Zellen dagegen sind persistent und es müssten nur erneut die Adaptermoleküle hinzugegeben werden. Somit können wiederum Kosten gespart werden, was für die klinische Zulassung von großem Interesse ist.

Viele weitere Varianten der bislang erforschten CAR-Systeme werden aktuell und zukünftig genauer untersucht, um das komplette Potenzial der Zellen auszunutzen und die noch bestehenden Hindernisse und Limitationen zu überwinden.

3. Surface-Activation-Matrix

In der vorliegenden Dissertation wurde das synchrone Immunotargeting mit dem Prinzip der SAM zur Therapie der drei AML-Zelllinien HL-60, U-937 und MOLM-13 mit Hilfe von AdCAR-T-Zellen untersucht (Vgl. II.6.). Die Idee war es, durch eine geschickte Kombination ausgewählter Adaptermoleküle (biotinylierter Antikörper) in subtherapeutischer Dosierung eine suffiziente Lyse zu induzieren, d.h. die zytolytische Aktivität der AdCARs gezielt gegen die AML-Blasten zu richten. Durch die SAM sollte erreicht werden, dass gesundes Gewebe von der zytolytischen Aktivität ausgespart wird, welche einzelne Zielantigene in geringerem Maße und nicht in der entsprechenden Kombination exprimieren.

Die Daten zeigen klar, dass die Kombination von Adaptermolekülen auch bei Konzentrationen unter der individuellen Aktivierungsgrenze jedes einzelnen Adaptermoleküls zu AdCAR-T-Zell-Aktivierung und Lyse der Zielzelle führt. Es konnte bei den AML-Zellreihen sogar eine überproportionale Zytolyse ohne signifikanten zytotoxischen Effekt der unspezifischen Kontrolle nach 24 bzw. 48 Stunden gezeigt werden: Die Kombination von 5 Antikörpern erreichte bei den HL-60-Zellen nach 24 h eine Lyse von 74 % (98 % mehr als der Kontrollantikörper), bei den U-937-Zellen nach 24 h eine Lyse von 87 % (98 % mehr als der Kontrollantikörper) und bei den MOLM-13-Zellen nach 48 h eine Lyse von 104 % (126 % mehr als der Kontrollantikörper). Betrachtet man diese Daten im Vergleich zur Lyse der einzelnen Antikörper, kann keine lineare Beziehung zwischen Antikörperkonzentration und entsprechender Lyse gefunden werden. Vielmehr deuteten sie auf einen Mechanismus hin, bei dem durch die Kombination der Antikörper ein Schwellenwert überschritten und eine Kaskade mit konsekutiver überproportionaler Lyse ausgelöst wird (Vgl. III.4.).

In Schaubild 28 (adaptiert von Seitz, 2018 [138]) wird die Tumorlyse durch die Integration von Expressionsprofilen veranschaulicht. Durch die Verwendung zweier biotinylierter Antikörper wird die Aktivierungsgrenze nicht überschritten (AdCAR 1 und 3). Erst durch die Kombination von vier biotinylierten Antikörpern wird die Aktivierungsschwelle überschritten und eine Lyse induziert (AdCAR 2).

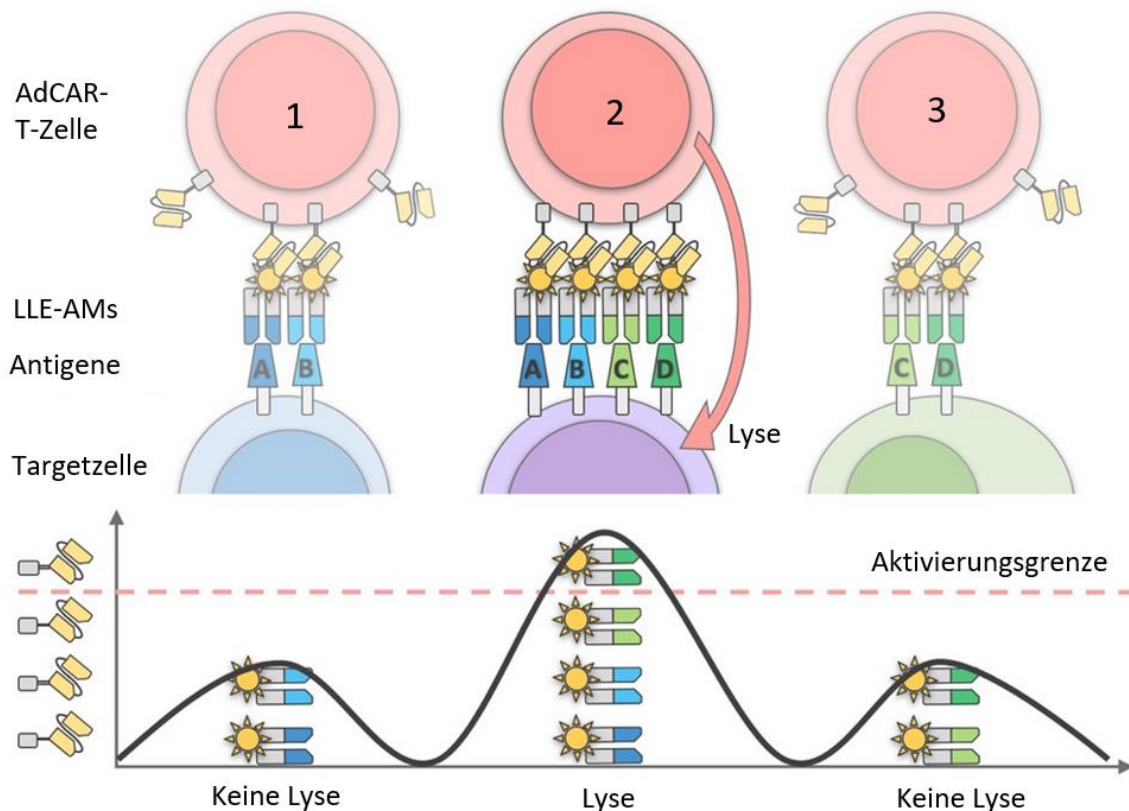


Abbildung 27: Identifizierung und Tumorlyse durch Integration von Expressionsprofilen

Die Targetzellen in blau und grün werden durch die Bindung zweier LLE-AMs nicht ausreichend aktiviert, um mit einer AdCAR-T-Zelle eine Lyse zu erzeugen. Durch synchrones Targeting von 4 Antigenen wird dagegen die Aktivierungsgrenze überschritten und eine Tumorlyse induziert. (Adaptiert von Seitz, 2018)

Durch gezielte Kombination und Dosiseinsparung der einzelnen Adaptermoleküle soll die zytolytische Aktivität der AdCAR-T-Zellen auf den Tumor fokussiert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass auf diesem Weg gesunde Zellen, die nur einen Bruchteil der entsprechenden Antigene tragen, geschont und relativ ausgespart werden können.

Mit dem Ziel, die Off-Tumor-Aktivität zu reduzieren und ein vergleichbares selektives Targeting zu erreichen, entwickelten Kloss et al eine neue „Tumor-Sensing-Strategie“ [139]. Sie kreierte Co-transduzierte T-Zellen, die zusätzlich zum CAR, der hier nur suboptimale Aktivierung liefert, noch einen weiteren chimären costimulatorischen Rezeptor (CCR) exprimieren, der ein zweites Antigen erkennt. Tumorzellen, die beide Prostatatumorantigene PSMA und PSCA exprimieren, wurden lysiert, wohingegen Tumorzellen, die nur eines der Antigene exprimieren, nicht lysiert wurden [139]. Durch das komplexe Dual-Signal-Targeting soll ebenfalls der On-Target-Off-Tumor-Effekt umgangen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen wiederum das Potential des selektiven, kombinatorischen Targetings.

4. Die Heterogenität der AML

Ein wesentliches Problem, auf das in dieser Arbeit in besonderem Maße Bezug genommen wird, stellt die breite biologische und klinische Heterogenität der Erkrankung dar [29-31]. Jede AML-Form zeigt eine unterschiedliche Bandbreite an Antigenen, welche wiederum in unterschiedlichen Expressionsverhältnissen auf der Oberfläche der Zellen vorhanden sind [31]. Bislang wurde kein Zielantigen identifiziert, das universell auf jedem AML-Subtyp exprimiert ist. Um das gesamte Spektrum der Erkrankung ausreichend abzudecken, wird vermutlich ein breiter Angriff auf eine Kombination verschiedener Antigene erforderlich sein.

Haubner et al zeigten, dass beim Großteil der beschriebenen Kohorte von 300 AML-Patienten besonders die Antigene CD33, CD123 und CLL1 in hohem Maße exprimiert waren [31]. Ehninger et al zeigten in ihrer Studie mit 319 AML-Patienten, dass entweder CD33 und/oder CD123 bei 97,2 % der Patienten exprimiert waren [35]. Durch diese großflächige Abdeckung kommt diesen beiden Antigenen eine bedeutende Rolle für die Kombinationstherapie zu. CD123 erreicht gleichzeitig Aufmerksamkeit durch seine hohe Expression auf leukämischen Stammzellen [45, 46]. Problematisch gestaltet sich hierbei jedoch die Koexpression auf normalem, gesundem Gewebe (Vgl. Abbildung 26), was zu der gefürchteten On-Target-Off-Tumor-Toxizität führen kann, wobei nicht nur maligne, sondern auch gesunde Zellen als Zielstruktur von den AdCAR-T-Zellen erkannt, angegriffen und zerstört werden.

Indem, wie im Rahmen der vorliegenden Dissertation praktiziert, zusätzlich zu diesen Erkenntnissen präklinisch ein Antigenscreening der AML-Zellen auf häufig vorkommende Antigene stattfindet, könnte man gezielt die Antikörper zur Kombination auswählen, die in hohem Maße auf den Tumorzellen, jedoch verhältnismäßig in geringem Maße auf anderen lebenswichtigen Geweben, Organen oder gesunden hämatopoetischen Stammzellen exprimiert sind. Inwieweit dieses individuelle Screening bei jedem Patienten in der Klinik kosten- und personaltechnisch umsetzbar ist, ist jedoch fraglich. In diesem Sinne wäre es das übergeordnete Ziel, ein Medikament zu entwickeln, das universell bei

allen Patienten eingesetzt werden kann, unabhängig von der genauen Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle. Hierbei soll das Prinzip der SAM ebenfalls einen Ausweg bieten, indem ein breiter Angriff auf unterschiedliche Antigene die Chance erhöht, eine überzeugende Zytolyse zu bewirken.

Besonders problematisch gestalten sich in Bezug auf die Auswahl eines optimalen Target-Antigens die Fluchtmechanismen der Tumorzellen, die den Erfolg der Therapie bedrohen [140]. Tumorzellen können ihre Oberflächenstrukturen derart verändern, dass sie bestimmte Antigene nach einer gewissen Zeit weniger oder sogar nicht mehr exprimieren, es also zu einem Antigenverlust kommt [77, 78, 81, 82, 109, 141]. Durch diese Immunevasion gelingt es dem Tumor, einer gezielten Therapie zu entgehen. Grund für den Antigenverlust sind besonders monovalente CAR-Systeme, die einen starken Selektionsdruck auf den Tumor bewirken. Die Antigenesevasion stellt einen der Hauptgründe für das Therapieversagen der CAR-Therapie dar [77, 78, 81, 82, 109, 141].

Um diesem Problem der Immunevasion zu begegnen, wird an neuen Therapien geforscht, die auf unterschiedliche Antigene gleichzeitig abzielen, mit dem Ziel, die Immunevasion zu umgehen. Einen Lösungsansatz hierfür stellen die CAR-T-Zellen dar [34, 76]. Besonders durch die Kombination von AdCAR-T-Zellen und dem Prinzip des synchronen multiplen Targetings könnte die Chance auf eine komplette Remission der Leukämie erhöht werden, indem die Gesamtheit der Blasten und Leukämiezellen durch die breite Therapie erreicht und folglich Resistenzen durch Antigenverlust vorgebeugt wird. Es ist es die Idee der SAM, durch eine geschickte Kombination von Antikörpern eine breite, flächendeckende Depletion der Leukämiezellen zu ermöglichen

5. Limitationen und Herausforderungen

Limitationen in Bezug auf die AML

Es zeigte sich bei Studien zur AML-Therapie mit dem humanisierten monoklonalen CD33-spezifischen Antikörper Gemtuzumab Ozogamicin ein Zusammenhang zwischen der Antigenexpression der Tumorzellen und der konsekutiven Zytotoxizität [142]. Folglich entstand die Überlegung, dass durch die Verwendung geringerer Antikörperkonzentrationen ein gewisser Grad an Toxizität eingespart werden kann. Als Resultat entstand das Konzept der SAM, durch das die zytolytische Aktivität der AdCAR-T-Zellen auf den Tumor fokussiert werden soll.

Ein essenzielles Problem bei der AML-Therapie stellt nämlich die On-Target-Off-Tumor-Toxizität dar, welche durch die Expression AML-typischer Antigene auf gesunden Zellen und Gewebearten erzeugt wird. Folglich werden nicht nur maligne, sondern auch gesunde Zellen als Zielstruktur von den AdCAR-T-Zellen erkannt, angegriffen und zerstört. Aufgrund dessen ist ein exklusives Targeting der AML bislang unmöglich. Um eine irreversible Toxizität auf jegliche Strukturen des Körpers zu verhindern, muss ein gezieltes, kontrolliertes und gut überlegtes Targeting in Betracht gezogen werden.

Haubner et al stellten in ihrer Arbeit „Coexpression profile of leucemic stem cell markers for combinatory targeted therapy in AML“ die Koexpression verschiedener AML-typischer Antigene auf gesundem Gewebe dar [31]. Abbildung 26 zeigt die Expressionen von CD33, CD123, CLL1 und TIM3 auf 43 unterschiedlichen Zell- und Gewebearten unterteilt in vier Kategorien, von nicht nachweisbar bis hoch exprimiert.

letalen Infektionen führen kann [144, 145]. Auch eine Fehlregulation des RES, wie sie bei der Histiozytose zu beobachten ist, kann durch unzureichende Steuerbarkeit der Zytokine bedrohlich sein. Den Makrophagen wird eine Mediatorrolle in der Entwicklung des CRS zugeschrieben, was wiederum ihre Bedeutung in Bezug auf das CAR-assoziierte Nebenwirkungsspektrum unterstreicht [146]. Beispielsweise führte die Anwendung von Anti-CD33-CAR-T-Zellen im Rahmen eines Fallberichts eines 41-jährigen Mannes zwar zu einer vorübergehenden Reduktion der AML-Blasten, jedoch gleichzeitig zu einem signifikanten CRS [109].

Aktuell sind bei der U.S. National Library of Medicine mehr als 40 klinische Studien zur Therapie der AML mit CARs registriert [147]. Insbesondere CD33, CD123 und CLL-1 treten hierbei in den Vordergrund.

CD123 ist als Target zur AML-Therapie besonders aufgrund seiner Überexpression auf leukämischen Stammzellen interessant. Die antileukämische Wirkung der CD123-spezifischen CAR-T-Zellen konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [52-54, 148]. Problematisch gestaltet sich jedoch die Interaktion mit Endothelzellen [48, 149]. Das Kapillarleck-Syndrom, das mit einer Schädigung von Endothelzellen verbunden ist, steht hierbei im Fokus. Es konnte gezeigt werden, dass IFN- γ und TNF- α jene Endothelschäden verschlimmern, die durch CD123-zielgerichtete CAR-T-Zellen verursacht wurden [48]. CD123-spezifische CAR-T-Zellen waren im präklinischen Modell dazu in der Lage, die AML komplett beseitigen. Dabei wurden in Xenotransplantat-Modellen jedoch nicht nur tumoröse Zellen, sondern auch gesunde Knochenmarkszellen eliminiert [150]. Gill et al postulierten hierbei die Möglichkeit eines neuen myeloablativen Konditionierungsschemas mit Anti-CD123-CAR-T-Zellen im Rahmen der AML Therapie [150, 151]. Im Gegensatz dazu zeigte eine klinische Studie unter Einbeziehung von 6 AML-Patienten unter anti-CD123-CAR-Therapie zwar antileukämische Aktivitäten, jedoch keine myeloablativen Effekte bei den Probanden [148]. Die Ergebnisse weiterer klinischer Studien sind nötig, um das Ausmaß der Toxizität genauer zu beurteilen.

CD371 oder auch CLL-1 bekommt aufgrund seiner hohen Expression auf AML-Zellen, einer Überexpression auf AML-Stammzellen und der Abwesenheit auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen Aufmerksamkeit [152]. Wang et al. nutzen Car-T-Zellen, die auf CLL-1 als Ansatz zur Behandlung der AML abzielen [153]. Sie konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine antileukämische Aktivität nachweisen. Hierbei wurden gesunde hämatopoetische Stammzellen, die CLL-1 nicht exprimieren, nicht eliminiert. Dies unterstreicht das Potential von CD371 als Ziel einer Immuntherapie. Erste klinische Studien mit CAR-T-Zellen, die gleichzeitig auf CD33 und CLL-1 abzielen, zeigte eine gute Wirksamkeit zur Therapie der refraktären AML [154]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich CD371 besonders bei der HL-60 und der U937-Zelllinie als geeignete Zielstruktur (Vgl. Tabelle 9 + 10, S 51)

CD38 ist auf der Oberfläche einiger Immunzellen wie B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und häufig auf AML-Blasten zu detektieren. Durch diese weitreichende Expression wird Potential für eine weitere Off-Tumor-Toxizität geschaffen. Die B- und T-Zelldepletion führt zu einem schweren Immundefekt, der lebensbedrohlich sein kann. Auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen ist CD38 jedoch nicht exprimiert, wodurch es wiederum als Target für die Therapie attraktiv wird [39, 40]. Es wird an Strategien gearbeitet, die Off-Tumor-Toxizität zu reduzieren. Eine dieser Strategien beinhaltet die Optimierung der Affinität von CAR-T-Zellen zu den Tumorzellen [155].

Ein weiteres, häufig auf leukämischen Stammzellen exprimiertes Antigen, stellt CD32 dar [56]. Durch sein breites Vorkommen auf Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, Plättchen und T-Zellen wird seine Nutzung als therapeutisches Target erschwert [56]. Ohne ein CAR-System mit geeigneten Sicherheitsmechanismen wie beispielsweise der SAM, muss mit weitreichenden Nebenwirkungen wie Blutungen und Immundefekten gerechnet werden. Dasselbe gilt für CD305, welches ebenfalls auf B-Zellen, T-Zellen NK-Zellen exprimiert ist, nicht jedoch die normale Hämatopoese beeinflusst [57, 58].

Bei Betrachtung dieser potenziellen Nebenwirkungen und Wechselwirkungen wird deutlich, dass nicht nur ein effektives, sondern auch ein sicheres und kontrollierbares Therapieprinzip zur Behandlung der AML von größter Bedeutung ist. Das in dieser Arbeit untersuchte Prinzip der SAM, angewandt auf AdCAR-T-Zellen, soll hierbei einen Ausweg in Bezug auf die On-Target-Off-Tumor-Toxizität aufzeigen.

In Schaubild 27 wird das Prinzip zur Einsparung der Toxizität mit Hilfe der SAM veranschaulicht. Gesunde körperliche Zellen, hier in blau, gelb und pink dargestellt, tragen exemplarisch nur ein einzelnes relevantes Antigen A, B oder C. Die Tumorzelle dagegen, hier in grün dargestellt, trägt gleichzeitig die Antigene A, B und C, die Angriffspunkt der Therapie darstellen sollen. Die normalen, gesunden Zellen sollen durch Expression eines einzelnen Antigens nicht lysiert, die Tumorzelle dagegen durch synchrones Targeting der verschiedenen Antigene lysiert werden [89].

Wichtig sind im Anschluss an diese Arbeit weitere Untersuchungen der Wirksamkeit der AdCAR-Therapie unter Einbeziehung der SAM auf gesundes Gewebe und gesunde hämatopoetische Stammzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

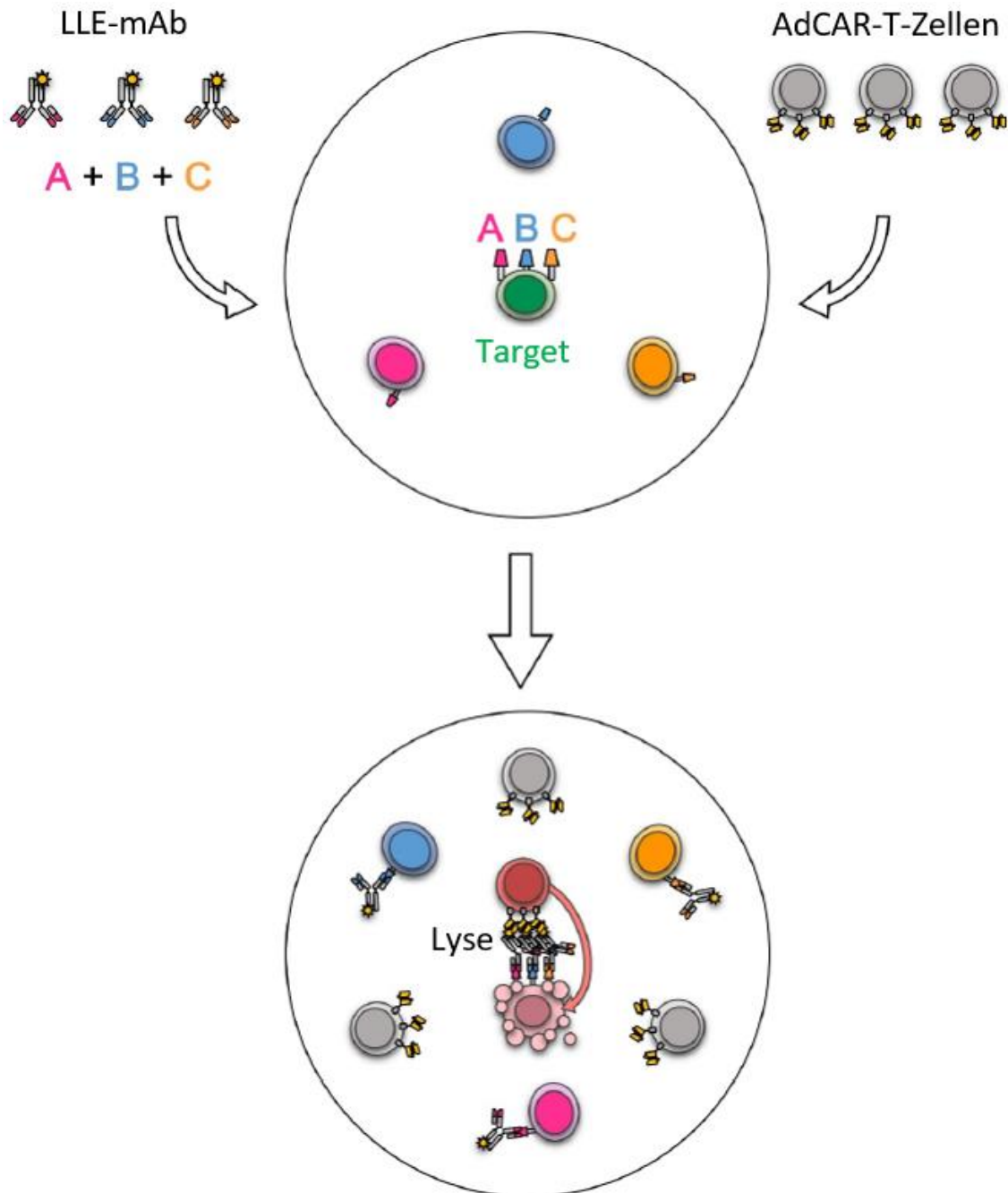


Abbildung 29: Differenzielles Targeting und Tumorlyse durch AdCAR-T-Zellen

Gesunde körperlische Zellen (blau, gelb und pink) dargestellt, tragen exemplarisch nur ein einzelnes relevantes Antigen A, B oder C. Die Tumorzelle (grün) exprimiert gleichzeitig die Antigene A, B und C, die als Angriffspunkt für die AdCAR-T-Zellen dienen. Die normalen, gesunden Zellen werden durch allein Expression eines einzelnen Antigens nicht lysiert, die Tumorzelle dagegen wird durch synchrones Targeting der verschiedenen Antigene lysiert.

(Grafik adaptiert aus dem Manuskript Seitz ...Kieble... et al. - Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting, in Revision bei Cancer Immunology Research)

Herausforderungen in Bezug auf AdCAR-T-Zellen

Aktuell sind die CAR-Systeme, ebenso das Adapter-CAR-System, noch nicht ausreichend erforscht: Es müssen weitere *in vitro* und *in vivo* Studien zum Nebenwirkungsspektrum, der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, der Effizienz und der klinischen Anwendbarkeit erfolgen [156]. Da die ersten CAR-T-Zellprodukte KYMRIAHA und YESCARTA erst im Jahr 2017 in den USA zugelassen wurden [157], fehlen folglich noch Langzeitergebnisse der CAR-Therapien [158].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich Unterschiede in den CAR-Expressionslevels je nach Spender der T-Zellen, wobei beispielsweise Spender D6 oft LNGFR-Expressionen in unzureichender Höhe erreichte (Vgl. Tabelle 11, S 54). Derartige interindividuelle Unterschiede müssen bedacht und ihre Auswirkungen auf die Therapie genauer untersucht werden, um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen. Weitere Forschung im Gebiet der AdCAR-Therapie ist nötig, um die Therapiemöglichkeiten auszubauen, zu perfektionieren und die Vielzahl an Vorteilen, die die Therapie in der Theorie und bereits *in vitro* mit sich bringt, gezielt *in vivo* und in den klinischen Alltag einzubauen. Hierzu müssen die Migration, Infiltration und Persistenz der CAR-T-Zellen optimiert werden, um das Potential der AdCAR-T-Zellen voll auszuschöpfen [89]. Dass das Prinzip des multiplen Targetings in subtherapeutischen Dosierungen funktioniert, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Im nächsten Schritt sollten nun genauere und erweiterte Untersuchungen folgen. Es können noch weitere Antikörper getestet werden, die Anzahl der Kombinationspartner kann erweitert und variiert werden. Andere Antikörper wie TIM-3, CD56, CD157 oder CD244 könnten dabei von Interesse sein, da sie ebenfalls mit der AML assoziiert sind [31, 159-161].

Wie gut ein LLE-mAb zur CAR-Therapie geeignet ist, hängt unter anderem von seiner Affinität zum passenden Antigen und somit von verschiedenen Faktoren ab. Es konnte gezeigt werden, dass die stöchiometrischen Beziehungen zwischen CAR und Zielantigen die Antitumorwirksamkeit von CAR-T-Zellen stark beeinflussen können [162], wodurch ein weiterer Manipulationsspielraum geschaffen wird. Es spielte eine Rolle, ob die Bindung des Epitops proximal

oder distal stattfindet [163]. Die Affinität und somit auch die Effektivität der CAR-T-Zellen variiert je nachdem, wie das LLE-mAb konstruiert und strukturiert ist [164]. Im Falle der AdCARs handelt es sich um eine semigerichtete Konjugation an freie Aminogruppen [89]. Genauere Untersuchungen zu diesem Thema könnten daher die Affinität und Effizienz der AdCAR-T-Zellen optimieren und somit die Tumorlyse verbessern.

Besonders in Bezug auf die AML ist die Affinität des CARs zur Tumorzelle von Bedeutung. Es gibt AML-Unterformen mit einer geringer Zelldichte, bei denen das AdCAR schnell und ungehindert zur Zielzelle gelangen kann. Zeigt sich jedoch eine höhere Zelldichte, wie beispielsweise bei einem Chlorom, das heißt bei einem myeloidem Sarkom, so könnte die Penetration des Adapters zur Zielzelle durch den dichten Zellverband behindert werden. Dieses Problem stellt bislang die CAR-Therapie solider Tumoren im Allgemeinen vor große Herausforderungen [165]. Im Rahmen von Untersuchungen zu Checkpoint-Inhibitoren wie dem monoklonalen Antikörper anti-PD-L1 konnte die Penetration ganzer Antikörper in den Tumor detektiert werden [166]. Die für das AdCAR-System verwendeten LLE-AMs können sowohl aus ganzen Antikörpern als auch aus kleineren Antikörperfragmenten hergestellt werden, welche aufgrund ihrer geringeren Größe noch besser in Tumoren penetrieren können [167]. Genauere Untersuchung zu Penetration und Wirksamkeit der AdCARs im menschlichen Körper abhängig von Tumor und Zelltypen sind noch ausstehend. Des Weiteren stellt sich die Frage nach der Penetration der AdCARs ins ZNS. Die Diffusion normaler Antikörper aus dem Körper ins ZNS wird für gewöhnlich von der Blut-Hirn-Schranke reguliert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bispezifische Antikörper dazu in der Lage sind, ins ZNS zu penetrieren [168]. Inwiefern AdCARs in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und welche Wirkungen sie bezüglich dessen mit sich bringen, steht noch im Raum. Ein weiterer essenzieller Punkt diesbezüglich ist der Zusammenbau (engl. der Assembly) von AdCAR-T-Zelle, LLE-AM und der antigenträgenden Tumorzelle, welches zur AdCAR-Aktivierung benötigt wird. Inwiefern dieses Assembly durch dichtere Tumorzellnester beeinträchtigt wird, wird für die Tumorthherapie von Bedeutung sein.

Essenziell für die Anwendung im klinischen Alltag ist auch die Integration in bestehende Therapiekonzepte. Untersuchungen der Kombination von CAR-T-Zellen mit anderen Therapieformen wie FLT3-Inhibitoren, STAT-Inhibitoren oder Stammzelltransplantationen stehen noch aus. Nach Induktion einer Leukapherese mit Hilfe von Chemotherapien könnte durch die Kombination mit AdCAR-T-Zellen, die schließlich dauerhaft genutzt werden können, ein enormes Potential geschaffen werden.

Ebenfalls interessant wäre additional die allogene Stammzelltransplantation mit Stammzellen, die vorher derart modifiziert wurden, dass sie gewisse Antigene nicht mehr exprimieren und somit der CAR-Therapie entgehen. Durch diesen gewollten Antigenverlust kombiniert mit AdCAR-T-Zellen, die gegen genau dieses Antigen gerichtet sind, könnten die Stammzellen geschützt werden und somit weitere Toxizität eingespart werden. Einzelne Forschungsgruppen beschäftigten sich mit diesem Thema und kreierten Methoden mit CRISPR-Cas9-CD33-knock-out-Stammzellen für eine allogene Stammzelltransplantation für AML-Patienten [169]. Im Mausmodell zeigte sich die Knock-Out-Methode als vielversprechend, wobei durch CD33-spezifische CAR-T-Zellen die AML-Zellen zerstört wurden und die modifizierten Stammzellen überlebten [170]. In Kombination mit dem multiplen Targeting, das in diesem Zusammenhang nicht nur die Stammzellen, sondern die Gesamtheit der gesunden Zellen schützen soll, bietet die AdCAR-Kombinationstherapie großes Potential, in Zukunft eine gelungene Alternative zur Therapie der AML darzustellen.

Zusammenfassend geben meine Ergebnisse tiefere Einblicke in die AdCAR-Technologie, durch die mit Hilfe der SAM eine patientenindividuelle Polyimmuntherapie ermöglicht wird. Die Wirksamkeit durch synchrones, sequenzielles kombinatorisches Targeting soll so auf den Tumor fokussiert und Toxizität durch Koexpression auf gesundem Gewebe vermindert werden. So könnte die Therapie besonders dann erleichtert werden, wenn kein passendes Antigen zur Verfügung steht, d.h. ein Antigen, welches nicht vital essenziell ist und somit als geeignetes Ziel dienen kann. Erste klinische *in vivo* Studien am Menschen zum Nachweis der Wirksamkeit und der Sicherheit des AdCAR-Systems und der SAM sind in Vorbereitung [89].

Aktuell wird die AML noch intensiv mit Chemotherapien behandelt. Durch das AdCAR-System, das Prinzip der SAM und der Möglichkeit der Kombinatorik der AMs könnte die AML-Therapie zukünftig eine neue Richtung einschlagen. Mit dem Ziel, die toxische Chemotherapie zu reduzieren oder gar komplett einzusparen, könnte die Behandlung für die Patienten einen großen Benefit sowohl in Bezug auf die Verträglichkeit der Therapie als auch für die Lebenserwartung bedeuten. Seit ihrer Erfindung haben sich die CAR-T-Zellen von einer experimentellen Idee zu einer wirksamen Therapieoption für Patienten mit unterschiedlichen, ansonsten teilweise unheilbaren Tumorerkrankungen entwickelt. Es gibt noch einige Hindernisse, die überwunden werden müssen, um das volle Potential der Zellen auszuschöpfen und die Therapie verschiedener Tumoren weg von toxischer Chemotherapie hin zu spezifischer CAR-Therapie zu bahnen. Mit Hilfe des synchronen Targetings der Adapter-CAR-T-Zellen wurde ein Schritt in die richtige Richtung eingelegt, die einen gewissen Grad an Kontrollierbarkeit, Flexibilität und Selektivität mit sich bringt.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das synchrone Immunotargeting mit Adapter-CAR-T-Zellen (AdCAR-T-Zellen) mit dem Prinzip der Surface Activation Matrix (SAM) zur Therapie der AML *in vitro* untersucht.

Die AML-Therapie ist bislang mit hohen Rezidivraten verbunden. Eine neue Therapieform stellen CAR-T-Zellen dar, die trotz ihres großen Potenzials zahlreiche Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, CRS und Off-Tumor-Toxizität auslösen. Besonders die AML stellt die Kliniker aufgrund ihrer biologischen Merkmale und der daraus resultierenden therapeutischen Limitationen vor große Herausforderungen. Die schwerwiegenden Nebenwirkungen der myeloischen Ablation und die Heterogenität der AML im Hinblick auf eine mögliche Immunevasion erfordern ein sicheres, flexibles, an- und abschaltbares System, mit dem die AML in der Gesamtheit erreicht werden kann.

Das AdCAR-System bietet hier einen möglichen Lösungsansatz, in dem Antigenerkennung und CAR-Aktivierung durch Zwischenschaltung von Adaptermolekülen, den LLE-mAbs, getrennt werden. Als AMs dienten die Antikörper bCD32, bCD33, bCD38, bCD123, bCD305 und bCD371, die in Bezug auf die AML-Zelllinien HL-60, U-937 und MOLM-13 untersucht wurden. Nach dem Prinzip der SAM ist zur Induktion einer Tumorlyse das Überschreiten einer Schwellenkonzentration des AMs nötig. Bei Verwendung von AMs unterhalb dieser Grenze konnte keine Lyse erzielt werden. Durch Kombination von 5 AMs in jeweils subtherapeutischer Dosierung konnte bei allen AML-Zelllinien eine signifikante, überproportionale Lyse induziert werden ohne signifikanten zytotoxischen Effekt der unspezifischen Kontrolle. Somit wird eine zielgerichtete Tumorlyse lediglich in der Kombinationstherapie ermöglicht. Die Wirksamkeit durch synchrones, kombinatorisches Targeting soll so auf den Tumor fokussiert und Toxizität durch Koexpression auf gesundem Gewebe vermindert werden, um die Nebenwirkungen der Therapie zu reduzieren und zu kontrollieren. Zusammenfassend wird durch das AdCAR-System und die SAM eine neue, effiziente Therapieform kreiert, die gleichzeitig einen Sicherheitsmechanismus enthält.

Literaturverzeichnis

1. Peter Kaatsch, C.S., Desiree Grabow, Cornelia Becker, *Jahresbericht des Kinderkrebsregisters 2018*. 2018.
2. Shallis, R.M., et al., *Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges*. *Blood Rev*, 2019. **36**: p. 70-87.
3. Deschler, B. and M. Lübbert, *Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology*. 2006. **107**(9): p. 2099-2107.
4. National Cancer Institute. *Cancer Stat Facts: Leukemia - Acute Myeloid Leukemia (AML)*. 2020; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
5. Turbeville, S., Francis, K. M., Behm, I., Chiu, G. R., Sanchez, H., Morrison, B. A., & Rowe, J. M., *Prevalence and Incidence of Acute Myeloid Leukemia May be Higher Than Currently Accepted Estimates Among the ≥65 Year-Old Population in the United States*. *Blood* 2014. **124**(21): p. 958.
6. J.L. Jameson, A.S.F., D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J. Loscalzo, *Harrison's Principles of internal medicine*. Vol. 1. 2018.
7. Eden, T., *Aetiology of childhood leukaemia*. *Cancer Treatment Reviews*, 2010. **36**(4): p. 286-297.
8. Li, S., C.E. Mason, and A. Melnick, *Genetic and epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia*. *Current opinion in genetics & development*, 2016. **36**: p. 100-106.
9. Weisberg, E., et al., *FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML*. *Drug Resistance Updates*, 2009. **12**(3): p. 81-89.
10. Schumacher, A., et al., *Fatigue as an important aspect of quality of life in patients with acute myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2002. **26**(4): p. 355-62.
11. Society, A.C. *Typical Treatment of Acute Myeloid Leukemia (Except APL)*. September 3, 2020; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/typical-treatment-of-aml.html>.
12. Fernandez, S., et al., *Targeting Tyrosine Kinases in Acute Myeloid Leukemia: Why, Who and How?* *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(14): p. 3429.
13. Liu, X. and Y. Gong, *Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia*. *Biomarker research*, 2019. **7**: p. 22-22.
14. Baron, J. and E.S. Wang, *Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute myeloid leukemia*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2018. **11**(6): p. 549-559.
15. Stentoft, J., *The toxicity of cytarabine*. *Drug Saf*, 1990. **5**(1): p. 7-27.
16. Gianni, L., et al., *Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008. **26**(22): p. 3777-3784.
17. Koreth, J., et al., *Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Clinical Trials*. *JAMA*, 2009. **301**(22): p. 2349-2361.

18. Howlader N, N.A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review 1975-2016*. 2019 Apeil 2019]; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.
19. Jensen, M.C. and S.R. Riddell, *Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells*. Immunological reviews, 2014. **257**(1): p. 127-144.
20. Eshhar, Z., et al., *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 720-4.
21. Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, *The basic principles of chimeric antigen receptor design*. Cancer Discov, 2013. **3**(4): p. 388-98.
22. Abken, H., M. Chmielewski, and A. Hombach, *Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells*. 2013. **4**(371).
23. Whilding, L.M. and J. Maher, *CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway?* Molecular Oncology, 2015. **9**(10): p. 1994-2018.
24. Finney, H.M., et al., *Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2791-7.
25. Abken, D.H., *CAR-T-Zellen: Wie Designer-Immun-zellen gegen den Krebs scharfgemacht werden können*. Trillium Immunologie, 2017. **Heft 1**.
26. Wilkie, S., et al., *Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling*. J Clin Immunol, 2012. **32**(5): p. 1059-70.
27. Zah, E., et al., *T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(6): p. 498-508.
28. Gargett, T. and M.P. Brown, *The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells*. 2014. **5**(235).
29. Zeijlemaker, W., J.W. Gratama, and G.J. Schuurhuis, *Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease*. 2014. **86**(1): p. 3-14.
30. Perna, F., et al., *Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML*. Cancer Cell, 2017. **32**(4): p. 506-519.e5.
31. Haubner, S., et al., *Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML*. Leukemia, 2019. **33**(1): p. 64-74.
32. Cheever, M.A., et al., *The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5323-37.
33. Laszlo, G.S., E.H. Estey, and R.B. Walter, *The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia*. Blood Reviews, 2014. **28**(4): p. 143-153.

34. Krupka, C., et al., *CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330*. *Blood*, 2014. **123**(3): p. 356-65.
35. Ehninger, A., et al., *Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia*. *Blood Cancer J*, 2014. **4**: p. e218.
36. Hills, R.K., et al., *Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(9): p. 986-96.
37. Hofmann, S., et al., *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML)*. *J Clin Med*, 2019. **8**(2).
38. Carol, O.H., et al., *Anti-CD33 chimeric antigen receptor targeting of acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2015. **100**(3): p. 336-344.
39. Naik, J., et al., *CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2019. **104**(3): p. e100-e103.
40. Alessio, M., et al., *CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells*. *J Immunol*, 1990. **145**(3): p. 878-84.
41. Naik, J., et al., *CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2018.
42. Assi, R., et al., *Immune therapies in acute myeloid leukemia: a focus on monoclonal antibodies and immune checkpoint inhibitors*. *Curr Opin Hematol*, 2018. **25**(2): p. 136-145.
43. Mistry, J.J., et al., *Daratumumab Inhibits AML Metabolic Capacity and Tumor Growth through Inhibition of CD38 Mediated Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Stromal Cells to Blasts in the Leukemic Microenvironment*. *Blood*, 2019. **134**(Supplement_1): p. 1385-1385.
44. Drent, E., et al., *Pre-clinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma*. 2016. **101**(5): p. 616-625.
45. Liu, K., et al., *CD123 and its potential clinical application in leukemias*. *Life Sci*, 2015. **122**: p. 59-64.
46. Jordan, C.T., et al., *The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells*. *Leukemia*, 2000. **14**(10): p. 1777-84.
47. Testa, U., E. Pelosi, and G. Castelli, *CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies*. *Cancers*, 2019. **11**(9): p. 1358.
48. Sun, Y., et al., *IFN- γ and TNF- α aggravate endothelial damage caused by CD123-targeted CAR T cell*. *OncoTargets and therapy*, 2019. **12**: p. 4907-4925.
49. Hu, M., et al., *Synergistic Combination Chemotherapy of Camptothecin and Floxuridine through Self-Assembly of Amphiphilic Drug-Drug Conjugate*. *Bioconjug Chem*, 2015. **26**(12): p. 2497-506.
50. Gill, S., et al., *Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells*. *Blood*, 2014. **123**(15): p. 2343-54.

51. He, S.Z., et al., *A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2015. **56**(5): p. 1406-15.
52. Mardiros, A., et al., *T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2013. **122**(18): p. 3138-48.
53. Kenderian, S.S., et al., *CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2015. **29**(8): p. 1637-1647.
54. Cummins, K.D., et al., *Treating Relapsed / Refractory (RR) AML with Biodegradable Anti-CD123 CAR Modified T Cells*. *Blood*, 2017. **130**(Supplement 1): p. 1359-1359.
55. Luo, Y., et al., *First-in-Man CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Treatment of Refractory Acute Myeloid Leukemia*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 3778-3778.
56. Saito, Y., et al., *Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(17): p. 17ra9.
57. Meyaard, L., *The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305)*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(4): p. 799-803.
58. Kang, X., et al., *The ITIM-containing receptor LAIR1 is essential for acute myeloid leukaemia development*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(5): p. 665-77.
59. Ma, H., et al., *Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy*. 2019. **12**(1): p. 41.
60. Kenderian, S.S., Ruella, M., Shestova, O., Klichinsky, M., Kim, M. Y., Soderquist, C., Bagg, A., Singh, R., Richardson, C., Young, R. M., June, C. H., & Gill, S. I., *Leukemia Stem Cells Are Characterized By CLEC12A Expression and Chemotherapy Refractoriness That Can be Overcome By Targeting with Chimeric Antigen Receptor T Cells*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 766.
61. van Rhenen, A., et al., *The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells*. *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2659-66.
62. Laborda, E., et al., *Development of A Chimeric Antigen Receptor Targeting C-Type Lectin-Like Molecule-1 for Human Acute Myeloid Leukemia*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(11).
63. Tashiro, H., et al., *Treatment of Acute Myeloid Leukemia with T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Directed to C-type Lectin-like Molecule 1*. *Mol Ther*, 2017. **25**(9): p. 2202-2213.
64. Wang, J., et al., *CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 7.
65. McHayleh, W., et al., *Chimeric Antigen Receptor T-Cells: The Future is Now*. *Journal of clinical medicine*, 2019. **8**(2): p. 207.
66. Lee, D.W., et al., *ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2019. **25**(4): p. 625-638.

67. Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D. L., Louis, C. U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S. A., & Mackall, C. L., *Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome*. *bloodjournal*, 2014. **124**(2): p. 188-195.
68. Shimabukuro-Vornhagen, A., et al., *Cytokine release syndrome*. *J Immunother Cancer*, 2018. **6**(1): p. 56.
69. Le, R.Q., et al., *FDA Approval Summary: Tocilizumab for Treatment of Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Severe or Life-Threatening Cytokine Release Syndrome*. *Oncologist*, 2018. **23**(8): p. 943-947.
70. Xu, X.J. and Y.M. Tang, *Cytokine release syndrome in cancer immunotherapy with chimeric antigen receptor engineered T cells*. *Cancer Lett*, 2014. **343**(2): p. 172-8.
71. Davila, M.L., et al., *Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra25.
72. Hunter, B.D. and C.A. Jacobson, *CAR T-cell associated neurotoxicity: Mechanisms, clinicopathologic correlates, and future directions*. *J Natl Cancer Inst*, 2019.
73. Kochenderfer, J.N., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Wilson, W. H., Spaner, D. E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., Yang, J. C., Kammula, U. S., Devillier, L., Carpenter, R., Nathan, D. N., Morgan, R. A., Laurencot, C., & Rosenberg, S. A, *B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor–transduced T cells*. *bloodjournal*, 2012. **119**(12): p. 2709-2720.
74. Morgan, R.A., et al., *Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2*. *Molecular Therapy*, 2010. **18**(4): p. 843-851.
75. Pollyea, D.A., et al., *Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials*. *Haematologica*, 2014. **99**(8): p. 1277-84.
76. Petrov, J.C., et al., *Compound CAR T-cells as a double-pronged approach for treating acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2018. **32**(6): p. 1317-1326.
77. Teague, R.M. and J. Kline, *Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions*. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2013. **1**(1): p. 13.
78. Zhou, G. and H. Levitsky, *Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape*. *Clinical & developmental immunology*, 2012. **2012**: p. 124187-124187.
79. Cummins, K.D. and S. Gill, *Chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: how close to reality?* *Haematologica*, 2019. **104**(7): p. 1302-1308.
80. Gardner, R., et al., *Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2406-10.
81. Shalabi, H., et al., *Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma*. *Haematologica*, 2018. **103**(5): p. e215-e218.

82. O'Rourke, D.M., et al., *A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(399).
83. Kugler, M., et al., *A recombinant trispecific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting*. *Br J Haematol*, 2010. **150**(5): p. 574-86.
84. Epperly, R., S. Gottschalk, and M.P. Velasquez, *Harnessing T Cells to Target Pediatric Acute Myeloid Leukemia: CARs, BiTEs, and Beyond*. *Children (Basel)*, 2020. **7**(2).
85. Slaney, C.Y., et al., *CARs versus BiTEs: A Comparison between T Cell–Redirection Strategies for Cancer Treatment*. 2018. **8**(8): p. 924-934.
86. Liu, D., J. Zhao, and Y. Song, *Engineering switchable and programmable universal CARs for CAR T therapy*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2019. **12**(1): p. 69.
87. Zhao, J., et al., *Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018. **11**.
88. Liu, K., et al., *Retargeted human avidin-CAR T cells for adoptive immunotherapy of EGFRvIII expressing gliomas and their evaluation via optical imaging*. *Oncotarget*, 2015. **6**(27): p. 23735-23747.
89. Seitz, C.M., ... Kieble ... , et al. , *Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting*. *Cancer Immunology Research*.
90. Biotec, M. *MACS Cell Separation* Available from: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588af033be3e24706bd/IM0020021.pdf.
91. Biotec, M. *Positive cell selection with MACS Technology* Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macs-cell-separation/macs-cell-separation-strategies.html>.
92. Bonner, W.A., et al., *Fluorescence activated cell sorting*. *Rev Sci Instrum*, 1972. **43**(3): p. 404-9.
93. Herzenberg, L.A., R.G. Sweet, and L.A. Herzenberg, *Fluorescence-activated cell sorting*. *Sci Am*, 1976. **234**(3): p. 108-17.
94. Bonin, A.L., M. Gossen, and H. Bujard, *Photinus pyralis luciferase: vectors that contain a modified luc coding sequence allowing convenient transfer into other systems*. *Gene*, 1994. **141**(1): p. 75-77.
95. Marques, S.M. and J.C. Esteves da Silva, *Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions*. *IUBMB Life*, 2009. **61**(1): p. 6-17.
96. Burnett, A., M. Wetzler, and B. Löwenberg, *Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia*. 2011. **29**(5): p. 487-494.
97. Sasine, J.P. and G.J. Schiller, *Acute Myeloid Leukemia: How Do We Measure Success?* *Curr Hematol Malig Rep*, 2016. **11**(6): p. 528-536.

98. Hurria, A., et al., *Predicting chemotherapy toxicity in older adults with cancer: a prospective multicenter study*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2011. **29**(25): p. 3457-3465.
99. Extermann, M., et al., *Predicting the risk of chemotherapy toxicity in older patients: The Chemotherapy Risk Assessment Scale for High-Age Patients (CRASH) score*. 2012. **118**(13): p. 3377-3386.
100. Volkova, M. and R. Russell, 3rd, *Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment*. Current cardiology reviews, 2011. **7**(4): p. 214-220.
101. Briot, T., et al., *Advances in treatment formulations for acute myeloid leukemia*. Drug Discov Today, 2018. **23**(12): p. 1936-1949.
102. *Akute myeloische Leukämie*. Onkopedia Leitlinie für Ärzte, Januar 2017.
103. Cartellieri, M., et al., *Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts*. Blood Cancer Journal, 2016. **6**(8): p. e458-e458.
104. John, S., et al., *A Novel Anti-LILRB4 CAR-T Cell for the Treatment of Monocytic AML*. Molecular Therapy, 2018. **26**(10): p. 2487-2495.
105. Maude, S.L., et al., *Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia*. N Engl J Med, 2014. **371**(16): p. 1507-17.
106. Park, J.H., et al., *Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2018. **378**(5): p. 449-459.
107. Maldini, C.R., G.I. Ellis, and J.L. Riley, *CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(10): p. 605-616.
108. Bonifant, C.L., et al., *Toxicity and management in CAR T-cell therapy*. Mol Ther Oncolytics, 2016. **3**: p. 16011.
109. Wang, Q.-s., et al., *Treatment of CD33-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells in One Patient With Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia*. Molecular Therapy, 2015. **23**(1): p. 184-191.
110. Pettitt, D., et al., *CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape*. Molecular Therapy, 2018. **26**(2): p. 342-353.
111. Castaigne, S., et al., *Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study*. The Lancet, 2012. **379**(9825): p. 1508-1516.
112. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia*. Science translational medicine, 2015. **7**(303): p. 303ra139-303ra139.
113. Scholler, J., et al., *Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells*. Sci Transl Med, 2012. **4**(132): p. 132ra53.
114. Ma, F., et al., *Evidence of long-lasting anti-CD19 activity of engrafted CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells in a phase I study targeting pediatrics with acute lymphoblastic leukemia*. Hematological oncology, 2019. **37**(5): p. 601-608.

115. Ma, J.S., et al., *Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(4): p. E450-8.
116. Rodgers, D.T., et al., *Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(4): p. E459-E468.
117. Seidel, U.J.E., et al., *Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2016. **24**(9): p. 1634-1643.
118. Lee, Y.G., H. Chu, and P.S. Low, *Abstract LB-187: New methods for controlling CAR T cell-mediated cytokine storms*. 2017. **77**(13 Supplement): p. LB-187-LB-187.
119. Lohmueller, J.J., et al., *mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting*. Oncoimmunology, 2017. **7**(1): p. e1368604-e1368604.
120. Bachmann, M., *The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells*. Immunology Letters, 2019. **211**: p. 13-22.
121. Kiefer, J.D. and D. Neri, *Immunocytokines and bispecific antibodies: two complementary strategies for the selective activation of immune cells at the tumor site*. Immunological reviews, 2016. **270**(1): p. 178-192.
122. Suurs, F.V., et al., *A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges*. Pharmacology & Therapeutics, 2019. **201**: p. 103-119.
123. Nagorsen, D. and P.A. Baeuerle, *Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab*. Exp Cell Res, 2011. **317**(9): p. 1255-60.
124. Huehls, A.M., T.A. Coupet, and C.L. Sentman, *Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy*. Immunology and cell biology, 2015. **93**(3): p. 290-296.
125. Miller, B.R., et al., *Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies*. Protein Engineering, Design and Selection, 2010. **23**(7): p. 549-557.
126. Hipp, S., et al., *A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo*. Leukemia, 2017. **31**(8): p. 1743-1751.
127. Deisting, W., et al., *Impact of Diverse Immune Evasion Mechanisms of Cancer Cells on T Cells Engaged by EpCAM/CD3-Bispecific Antibody Construct AMG 110*. PLOS ONE, 2015. **10**(10): p. e0141669.
128. Kebenko, M., et al., *A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE®) antibody construct, in patients with refractory solid tumors*. Oncoimmunology, 2018. **7**(8): p. e1450710.
129. Laszlo, G.S., et al., *Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML*. Blood, 2014. **123**(4): p. 554-561.
130. Lee, H.Y., et al., *Development of a bioassay to detect T-cell-activating impurities for T-cell-dependent bispecific antibodies*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 3900.

131. Vinay, D.S. and B.S. Kwon, *4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy*. BMB reports, 2014. **47**(3): p. 122-129.
132. Hernandez-Chacon, J.A., et al., *Costimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances antitumor effector function*. J Immunother, 2011. **34**(3): p. 236-50.
133. Tettamanti, S., et al., *Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor*. 2013. **161**(3): p. 389-401.
134. Rezvani, K. and R.H. Rouse, *The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer*. Frontiers in immunology, 2015. **6**: p. 578-578.
135. Klingemann, H., *Are natural killer cells superior CAR drivers?* Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28147-e28147.
136. Xie, G., et al., *CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer*. EBioMedicine, 2020. **59**.
137. Lupo, K.B. and S. Matosevic, *Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).
138. Seitz, C.M., et al., *Combinatorial Targeting of Multiple Shared Antigens By Adapter-CAR-T Cells (aCAR-Ts) Allows Target Cell Discrimination and Specific Lysis Based on Differential Expression Profiles*. Blood, 2018. **132**(Supplement 1): p. 4543-4543.
139. Kloss, C.C., et al., *Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(1): p. 71-5.
140. Mardiana, S. and S. Gill, *CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions*. Frontiers in oncology, 2020. **10**: p. 697-697.
141. Lee, D.W., et al., *T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet, 2015. **385**(9967): p. 517-528.
142. Walter, R.B., et al., *Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1295-1302.
143. Baas, J., N. Senninger, and H. Elser, *[The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement]*. Z Gastroenterol, 1994. **32**(2): p. 117-23.
144. Germic, N., et al., *Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation*. Cell Death & Differentiation, 2019. **26**(4): p. 715-727.
145. Williams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes*. Immunity, 2018. **49**(4): p. 595-613.
146. Hao, Z., et al., *Macrophage, the potential key mediator in CAR-T related CRS*. Experimental Hematology & Oncology, 2020. **9**(1): p. 15.
147. Trials.gov, U.N.L.o.S.C., *US National Library of Science Clinical Trials.gov*. 2020.

148. Budde, L., et al., *Remissions of Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Following Treatment with CD123-Specific CAR T Cells: A First-in-Human Clinical Trial*. *Blood*, 2017. **130**(Supplement 1): p. 811-811.
149. Arcangeli, S., et al., *Unraveling the Efficacy and Safety Profiles of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptors (CARs) in a Model of Acute Myeloid Leukemia Immunotherapy By Investigating CAR Binding Affinity and Density Variables*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 1359-1359.
150. Gill, S., et al., *Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-123) Provide A Novel Myeloablative Conditioning Regimen That Eradicates Human Acute Myeloid Leukemia In Preclinical Models*. *Blood*, 2013. **122**(21): p. 143-143.
151. Gill, S., et al., *Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor–modified T cells*. *Blood*, 2014. **123**(15): p. 2343-2354.
152. Kenderian, S.S., et al., *Targeting CLEC12A with Chimeric Antigen Receptor T Cells Can Overcome the Chemotherapy Refractoriness of Leukemia Stem Cells*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2017. **23**(3): p. S247-S248.
153. Wang, J., et al., *CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018. **11**(1): p. 7.
154. Liu, F., et al., *First-in-Human CLL1-CD33 Compound CAR T Cell Therapy Induces Complete Remission in Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia: Update on Phase 1 Clinical Trial*. *Blood*, 2018. **132**(Supplement 1): p. 901-901.
155. Drent, E., et al., *A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization*. *Mol Ther*, 2017. **25**(8): p. 1946-1958.
156. Srivastava, S. and S.R. Riddell, *Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Challenges to Bench-to-Bedside Efficacy*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2018. **200**(2): p. 459-468.
157. Administration, U.S.F.a.D. *FDA approval brings first gene therapy to the United States*. 2017 August 30, 2017]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>.
158. Zheng, P.P., J.M. Kros, and J. Li, *Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts*. *Drug Discov Today*, 2018. **23**(6): p. 1175-1182.
159. Kikushige, Y., et al., *TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(6): p. 708-17.
160. Krupka, C., et al., *Targeting CD157 in AML using a novel, Fc-engineered antibody construct*. *Oncotarget*, 2017. **8**(22): p. 35707-35717.
161. Zhang, F., et al., *CD244 maintains the proliferation ability of leukemia initiating cells through SHP-2/p27^{kip1} signaling*. 2017. **102**(4): p. 707-718.
162. Walker, A.J., et al., *Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase*. *Mol Ther*, 2017. **25**(9): p. 2189-2201.

163. Hombach, A.A., et al., *T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: The Position of the Binding Epitope within the Target Molecule Determines the Efficiency of Activation of Redirected T Cells*. 2007. **178**(7): p. 4650-4657.
164. Hudecek, M., et al., *Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells*. 2013. **19**(12): p. 3153-3164.
165. Newick, K., et al., *CAR T Cell Therapy for Solid Tumors*. 2017. **68**(1): p. 139-152.
166. Deng, R., et al., *Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor*. *mAbs*, 2016. **8**(3): p. 593-603.
167. Xenaki, K.T., S. Oliveira, and P.M.P. van Bergen en Henegouwen, *Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors*. 2017. **8**(1287).
168. Stanimirovic, D., et al., *Chapter Ten - Engineering and Pharmacology of Blood–Brain Barrier-Permeable Bispecific Antibodies*, in *Advances in Pharmacology*, T.P. Davis, Editor. 2014, Academic Press. p. 301-335.
169. Cummins, K.D., et al., *Optimization of CRISPR-Cas9 knock-out of CD33 in human hematopoietic stem / progenitor cells for allogeneic transplantation in patients with acute myeloid leukemia*. *Cytotherapy*, 2019. **21**(5, Supplement): p. S16-S17.
170. Kim, M.Y., et al., *Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia*. *Cell*, 2018. **173**(6): p. 1439-1453.e19.

Lizenzen der Abbildungen

Zu Abbildung 30: Antigen Koexpression in normalen Geweben



?
Help

✉
Email Support

SPRINGER NATURE

Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML

Author: S. Haubner et al
Publication: Leukemia
Publisher: Springer Nature
Date: Jun 26, 2018

Copyright © 2018, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Hämatologie/Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz als Betreuer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Studentin Selina Reiter und Labormitglied Stephanie Zug von mir eigenständig durchgeführt. Die Herstellung und Pflege der AdCAR-T-Zellen erfolgten gemeinsam mit Doktorandin Clara Illi.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz.

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Abstract veröffentlicht: Seitz, C.M. et al., *Combinatorial Targeting of Multiple Shared Antigens By Adapter-CAR-T Cells (aCAR-Ts) Allows Target Cell Discrimination and Specific Lysis Based on Differential Expression Profiles*. Blood, 2018. **132**(Supplement 1): p. 4543-4543. Weitere Teile der Arbeit wurden als Manuskript eingereicht, befinden sich aktuell in Revision bei Cancer Immunology Research und sind folgendermaßen gekennzeichnet: Seitz, C.M., ...Kieble... et al., *Novel Adapter CAR-T cell Technology for precisely controllable Multiplex Cancer Targeting*, H.a.O. Department of General Pediatrics, University Children's Hospital Tuebingen, Germany [89].

Tübingen, den

Danksagung

Mein Dank gilt all den Personen, die mich während und nach der Zeit im Labor begleitet und unterstützt haben.

Prof. Dr. Peter Lang, Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz für die gelungene Auswahl der Thematik, die kompetente Betreuung und die Ermöglichung meiner experimentellen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Patrick Schlegel, der zu jeder Zeit für Fragen offen war und mich für die Forschung motivieren und begeistern konnte.

Dem ärztlichen Direktor Prof. Dr. Handgretinger danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen.

Selina Reiter und Stephanie Zug möchte ich danken für die ausführliche Einführung in die Thematik, die Einarbeitung im Labor und die Unterstützung bei aufgetretenen Problemen und Fragestellungen.

Mein Dank gilt auch den beteiligten Mitarbeitern, Kolleginnen und Kollegen der anderen Forschungsgruppen der Kinderklinik für die Einarbeitung in die verschiedenen Geräte, die Beantwortung meiner Fragen, die Diskussionen, Überlegungen und die Zeit, die sie sich genommen haben.

Meinen Freunden möchte ich für die moralische Unterstützung danken, besonders in den Zeiten, in denen nicht alles funktioniert hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu dieser experimentellen Dissertation ermutigt haben, immer geduldig waren und mich in jeder Lebenslage unterstützen.

Ich habe die Zeit im Labor sehr genossen, mich selbst weiterentwickelt und viele Erfahrungen für mein weiteres Leben gesammelt. Dafür bin ich sehr dankbar.