

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

Surface Activation Matrix mit Adapter CAR (AdCAR)-T-Zellen

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

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

vorgelegt von

Illi, Clara Charlotte

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 06.08.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung	1
1.1 Hämatologische Malignome - B-phänotypische Malignome.....	3
1.2 Solide Malignome im Kindesalter - das Neuroblastom.....	4
1.3 Solide Malignome im Erwachsenenalter - das Mammakarzinom.....	5
1.4 Potenzielle Zielstrukturen der AdCAR-T-Zell-Therapie.....	6
1.4.1 Antigene von B-phänotypischen Malignomen.....	6
1.4.1.1 CD19.....	7
1.4.1.2 CD10.....	8
1.4.1.3 CD138.....	9
1.4.1.4 CD22.....	9
1.4.1.5 ROR-1.....	9
1.4.1.6 CD20.....	10
1.4.1.7 CD79.....	10
1.4.1.8 CD37.....	10
1.4.2 Antigene des Neuroblastoms.....	11
1.4.2.1 GD2.....	11
1.4.2.2 CD276.....	12
1.4.2.3 CD171.....	12
1.4.2.4 CD81.....	13
1.4.2.5 CD117.....	13
1.4.3 Antigene des Mammakarzinoms.....	14
1.4.3.1 EGFR.....	14

1.4.3.2	CD47.....	14
1.4.3.3	ROR-1	15
1.4.3.4	CD276.....	15
1.5	CAR-T-Zellen.....	15
1.6	AdCAR-T-Zellen.....	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren	24
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.1.4	Antikörper und Zytokine.....	26
2.1.4.1	Fluorophor-markierte Antikörper.....	26
2.1.4.2	Biotinylierte Antikörper.....	27
2.1.5	Software	28
2.1.6	Zellkulturmedien	28
2.1.7	Zellmaterial	29
2.2	Zellkultur und Zelllinien	30
2.2.1	Zellpflege von Suspensionszellen	31
2.2.2	Zellpflege adhärenter Zellen	31
2.2.3	Einfrieren.....	32
2.2.4	Auftauen.....	32
2.2.5	Zytokinfreie Kultivierung von AdCAR-T-Zellen	33
2.3	Durchflusszytometrie.....	33
2.3.1	Durchführung	35
2.3.2	Auswertung	35

2.3.3	Transduktionskontrolle des Luciferase-Gens	36
2.3.4	Kontrolle der Antigenexpression der Tumorzelllinien	37
2.3.5	Zellsortierung einer Zelllinie	37
2.4	Magnetic Activated Cell Sorting	38
2.4.1	Durchführung	39
2.5	Herstellung von AdCAR-T-Zellen	40
2.5.1	PBMC-Isolierung	40
2.5.2	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ -T-Zellen-Isolierung	42
2.5.3	Stimulation der T-Zellen	42
2.5.4	Virale Transduktion	42
2.5.5	TransAct-Verdünnung	43
2.5.6	Ermittlung der Transduktionseffizienz: LNGFR-FC	43
2.5.7	LNGFR ⁺ -T-Zellen-Isolierung	44
2.6	Zytotoxizitätsassays	45
2.6.1	Luciferase-basiertes Zytotoxizitätsassay	45
2.6.1.1	Durchführung	45
2.6.1.2	Aufbau der verschiedenen Experimente	47
2.6.1.3	Auswertung	49
2.6.2	Durchflusszytometrie-basiertes Zytotoxizitätsassay	50
2.6.2.1	Durchführung	50
2.6.2.2	Auswertung	52
3	Ergebnisse	55
3.1	Kontrolle der Luciferase-Expression transduzierter Tumorzelllinien	55
3.2	Antigenexpression der Tumorzelllinien	56
3.2.1	Nalm-6 (BCP-ALL)	56
3.2.2	JeKo-1 (B-NHL)	57

3.2.3 LS (Neuroblastom)	59
3.2.4 HS-578T (Mammakarzinom)	60
3.3 Kontrolle der Herstellung der AdCAR-T-Zellen.....	60
3.4 Luciferase-basierte Zytotoxizitätsassays.....	62
3.4.1 Nalm-6 (BCP-ALL).....	63
3.4.1.1 E:T-Titration.....	63
3.4.1.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	64
3.4.1.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	67
3.4.1.4 Multiples Targeting	69
3.4.2 JeKo-1 (B-NHL).....	70
3.4.2.1 E:T-Titration.....	70
3.4.2.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	72
3.4.2.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	75
3.4.2.4 Multiples Targeting	78
3.4.3 LS (Neuroblastom)	80
3.4.3.1 E:T-Titration.....	80
3.4.3.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	81
3.4.3.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	84
3.4.3.4 Multiples Targeting	87
3.4.4 HS-578T (Mammakarzinom).....	89
3.4.4.1 E:T-Titration.....	89
3.4.4.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	90
3.4.4.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	92
3.4.4.4 Multiples Targeting	95
3.5 Durchflusszytometrie-basierte Zytotoxizitätsassays.....	96
3.5.1 JeKo-1 (B-NHL).....	96

3.5.1.1	Sequenzielles Targeting	96
3.5.2	Nalm-6 (BCP-ALL).....	100
3.5.2.1	Antigenexpression gesunder B-Zellen.....	100
3.5.2.2	LLE mAb-Titration.....	101
3.5.2.3	Differenzielles Targeting	103
4	Diskussion	106
4.1	Bedarf einer CAR-T-Zell-Therapie - AdCAR-T-Zell-System als vielversprechender Behandlungsansatz.....	106
4.2	Anwendung der AdCAR-T-Zell-Therapie bei soliden Tumoren	108
4.3	Alternative Therapiestrategien	110
4.3.1	Weitere CAR-T-Zell-Adaptersysteme	110
4.3.2	CAR-NK-Zellen	111
4.3.3	Bispezifische Antikörper.....	112
4.4	Auswahl der Tumorzelllinien und Zielantigene	113
4.5	Einflussfaktoren auf die Tumorlyse.....	114
4.6	Kombinatorisches Targeting	117
4.6.1	Das Prinzip der Surface Activation Matrix.....	117
4.6.2	Multiples Targeting.....	118
4.6.3	Sequenzielles Targeting	120
4.6.4	Differenzielles Targeting	120
4.7	Diskussion der Methodik	123
4.7.1	Antigenexpression	123
4.7.2	Bewertung der Lyse.....	123
4.7.3	Übertragung auf die klinische Anwendung.....	125
4.8	Ausblick: AdCAR-T-Zell-Therapie in Kombination mit anderen Therapien	125
5	Zusammenfassung	127

6	Literaturverzeichnis	128
7	Erklärung zum Eigenanteil	145
8	Danksagung.....	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau eines CAR.....	17
Abbildung 1.2: Aufbau eines AdCAR und eines Adaptermoleküls	20
Abbildung 1.3: Darstellung der AdCAR-T-Zellen-vermittelten Tumorlyse	21
Abbildung 2.1: Aufbau eines Durchflusszytometers	34
Abbildung 2.2: FlowJo-Gating Strategie zur Ermittlung der Antigenexpression (am Beispiel von Nalm-6 und CD19)	36
Abbildung 2.3: Zellseparation mittels MACS	39
Abbildung 2.4: Schichtung des Vollbluts über Biocoll	41
Abbildung 2.5: Auftrennung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte	41
Abbildung 2.6: FlowJo-Gating Strategie zur Ermittlung der LNGFR-Transduktion.....	44
Abbildung 2.7: Excel Auswertung - Ausgleichsgerade	50
Abbildung 2.8: FlowJo-Gating Strategie bei Experimenten mit JeKo-1 Zelllinien	53
Abbildung 2.9: FlowJo-Gating Strategie bei Experimenten mit Nalm-6/gesunden B-Zellen.....	54
Abbildung 3.1: Luciferase-Expression der Tumorzelllinien.....	55
Abbildung 3.2: Antigenexpression der Nalm-6 Zellen.....	56
Abbildung 3.3: Antigenexpression der JeKo-1 Zelllinien	58
Abbildung 3.4: Antigenexpression der LS Zellen	59
Abbildung 3.5: Antigenexpression der HS-578T Zellen	60
Abbildung 3.6: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - E:T-Titration	64
Abbildung 3.7: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	66
Abbildung 3.8: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	69
Abbildung 3.9: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Kombination	70
Abbildung 3.10: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - E:T-Titration	71
Abbildung 3.11: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	75
Abbildung 3.12: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	78
Abbildung 3.13: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Kombination	79

Abbildung 3.14: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - E:T-Titration	81
Abbildung 3.15: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	84
Abbildung 3.16: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	87
Abbildung 3.17: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - LLE-mAb-Kombination	88
Abbildung 3.18: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - E:T-Titration.....	89
Abbildung 3.19: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL	92
Abbildung 3.20: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL.....	94
Abbildung 3.21: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Kombination.....	96
Abbildung 3.22: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - Zielantigen-spezifisches Targeting	97
Abbildung 3.23: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - sequenzielles Targeting	99
Abbildung 3.24: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - sequenzielles Targeting ...	100
Abbildung 3.25: Antigenexpression der PBMC.....	100
Abbildung 3.26: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL.....	103
Abbildung 3.27: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Kombination.....	104
Abbildung 3.28: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Kombination.....	105
Abbildung 4.1: Prinzip der AdCAR-T-Zell-Aktivierung - Surface Activation Matrix	118
Abbildung 4.2: Selektive Tumorlyse durch differenzielles Targeting mittels SAM....	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Immunphänotypen der B-Zell-Entwicklungsstadien.....	7
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte	23
Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren.....	24
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	25
Tabelle 2.4: Verwendete Beads und Zytokine	26
Tabelle 2.5: Verwendete Fluorophor-markierte Antikörper	26
Tabelle 2.6: Verwendete biotinylierte Antikörper.....	27
Tabelle 2.7: Verwendete Software.....	28
Tabelle 2.8: Verwendete Bestandteile für Zellkulturmedien	28
Tabelle 2.9: Zelllinien-abhängige Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	29
Tabelle 2.10: Grundaufbau eines Pipettierschemas.....	45
Tabelle 2.11: Zusammensetzung der verschiedenen Versuchsbedingungen.....	46
Tabelle 2.12: Pipettierschema der E:T-Titration (am Beispiel von JeKo-1).....	47
Tabelle 2.13: Pipettierschema der LLE-mAb-Titration (am Beispiel von JeKo-1)	48
Tabelle 3.1: Prozentuale Luciferase-Expression und MFI-Ratio der Tumorzelllinien... 55	
Tabelle 3.2: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der Nalm-6 Zellen.....	56
Tabelle 3.3: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der JeKo-1 Zelllinien.....	57
Tabelle 3.4: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der LS Zellen.....	59
Tabelle 3.5: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der HS-578T Zellen.....	60
Tabelle 3.6: Überblick über die Expansionen der AdCAR-T-Zellen	61
Tabelle 3.7: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der PBMC	101

Abkürzungsverzeichnis

AdCAR	adapter chimeric antigen receptor
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ALL	akute lymphatische Leukämie
AM	Adaptermolekül
APC	Allophycocyanin
BCP-ALL	B-cell precursor ALL
BCR	B-cell-receptor
BCMA	B-cell maturation antigen
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BiTE	bispecific T-cell engager
bFGF	basic fibroblast growth factor
B-NHL	B-zelluläres Non-Hodgkin Lymphom
BRCA	breast cancer
BUV	brilliant ultraviolett
bzw.	beziehungsweise
CAM	cell adhesion molecule
CAR	chimeric antigen receptor
CD	cluster of differentiation
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CIS	carcinoma in situ
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma
CRS	cytokine release syndrome
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESCC	esophageal squamous cell carcinoma
E:T-Ratio	effector cell to target cell ratio
Fab	antigen-binding fragment
FACS	fluorescence activated cell sorting
FC	flow cytometry
Fc	crystallisable fragment

FCS	fetal calf serum
FDA	food and drug administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	forward scatter
g	relative Erdbeschleunigung
h. i.	hitzeinaktiviert
HER	human epidermal growth factor receptor
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
IBC	inflammatory breast cancer
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KO	knockout
LCA	luciferase based cytotoxicity assay
LLE	linker-label-epitope
LNGFR	low-affinity nerv growth factor receptor
Luc	Luciferase
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	magnetic activated cell sorting
MFI	median fluorescence intensity
MFIR	median fluorescence intensity ratio
MIBG	Methyliodbenzylguanidin
MHC	major histocompatibility complex
n	Anzahl der Einzelmessungen
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
PBS	phosphat buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1

PE	Phycoerythrin
P/S	Penicillin/Streptomycin
R	Bremse (Zentrifuge)
ROR-1	tyrosine kinase-like orphan receptor 1
SAM	surface activation matrix
scFv	single chain of variable region
SPIIT	Screeningplattform für individuelles Immunotargeting
SSC	side scatter
SZT	Stammzelltransplantation
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T-cell receptor
TGF	transforming growth factor
TNBC	triple-negative breast cancer
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die Inzidenz von Tumorerkrankungen ist weltweit steigend. Verantwortlich dafür sind unter anderem Umweltfaktoren wie das Rauchen, die Luftverschmutzung, veränderte Lebensgewohnheiten und eine erhöhte Lebenserwartung [1]. Die Tumorthherapie befindet sich in einem grundlegenden Wandel. Das jüngst gewonnene Wissen über Tumore und deren molekulargenetische Vielfalt verlangt nach neuen Ansätzen. Inzwischen hat sich die Prognose bei vielen Tumoren durch vielfältige, individualisierte Therapiestrategien enorm verbessert [2]. Darüber hinaus werden neue Technologien entwickelt, die den Tumor gezielt angreifen und das gesunde Gewebe schonen. Besonders bei Tumorerkrankungen im Kindesalter besteht allerdings weiterhin das Problem der unspezifischen Toxizität und langanhaltenden Nebenwirkungen/Folgen herkömmlicher Therapien [3, 4].

Die Chemotherapie als systemische Behandlung fluider Tumore verbessert sich kontinuierlich und führt durch neue Medikamente stetig zu einer Verbesserung der Überlebensraten [5]. Sie richtet sich nicht spezifisch gegen die Tumorzellen, sondern schädigt alle sich schnell teilenden Zellen. Dabei sind unter anderem die Zellen der Schleimhäute und des Bluts betroffen [3]. Je nach Dosierung und Art der Therapie treten dadurch unterschiedlich starke akute und langfristige Nebenwirkungen auf, die therapielimitierend sein können. Besonders schwerwiegend ist eine irreversible Toxizität auf das Knochenmark, das in Einzelfällen auftreten kann. Es kommt zu Stromadefekten, welche die Hämatogenese beeinträchtigen [6]. Wiederholte Therapiezyklen oder nachfolgende Knochenmarktransplantationen können zu einer Knochenmarksinsuffizienz oder einem myelodysplastischen Syndrom führen [7]. Des Weiteren können das Herz und die ausscheidenden Organe Leber und Niere beeinträchtigt werden und sollten deshalb lebenslang regelmäßig untersucht werden [3]. Unabhängig von den Toxizitäten stellt die Entstehung von Resistenzen gegen die Behandlung das Hauptproblem in der Tumorthherapie dar [8]. Hierdurch kommt es zum Fortschreiten der Primärerkrankung oder zu Rezidiven des Tumors.

Bei der Strahlentherapie von soliden Tumoren kommt es zu einer unvermeidbaren Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes, welche zu schwerwiegenden Nebenwirkungen und schmerzhafter Fibrosierung führt [4].

Mögliche neue, vielversprechende Strategien beinhalten Immuntherapien und zielgerichtete Tumorthérapien wie beispielsweise mit *Chimeric antigen receptor* (CAR)-T Zellen oder bispezifischen T-Zellen-rekrutierenden Antikörpern (englisch *bispecific T-cell engager*, BiTE). Diese könnten die genannten Probleme umgehen und komplementär aktuelle Therapiestrategien verbessern. Die Immuntherapie, die bereits Anwendung in der Klinik findet, zielt darauf ab, das Immunsystem spezifisch gegen die Tumorzellen zu aktivieren. Dabei werden unter anderem unkonjugierte monoklonale Antikörper (englisch *monoclonal antibody*, mAb) oder konjugierte mAb mit Zytostatika, Toxinen oder Radioisotopen eingesetzt [9]. Die Antigen-bindende Domäne des mAb bindet spezifisch an Oberflächenstrukturen der Tumorzelle. Ziel der konjugierten mAb ist es, den Wirkstoff möglichst spezifisch zu den Zielantigen-tragenden Tumorzellen zu transportieren, um die therapeutische Effizienz zu verbessern und die systemische Toxizität zu reduzieren [10]. Zusätzlich erfolgt eine Internalisierung der konjugierten Wirkstoffe über Rezeptoren in die Tumorzellen (beispielsweise B-Zell Co-Rezeptor CD22) [11]. Unkonjugierte mAb werden anhand ihrer konstanten (englisch *crystallisable fragment*, Fc)-Domäne von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) mithilfe von Fc-Rezeptoren erkannt. Die Tumorzellen werden also durch Opsonierung für Immunzellen erkennbar gemacht. Hierdurch wird eine zielgerichtete, spezifische Lyse von Tumorzellen durch Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (englisch *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) ermöglicht. Komplementfixierende mAb wirken zusätzlich durch die Aktivierung der Komplementkaskade toxisch (englisch *complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Die Kombination der Therapie mit der zusätzlichen Applikation von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-2 oder IL-15, kann Fc-tragende Zellen in ihrer Proliferation und Aktivität positiv beeinflussen und dadurch die ADCC verbessern, wodurch konsekutiv der Antitumoreffekt und damit das mittlere Überleben verbessert werden kann [12].

Erfolgreiche Beispiele sind das CD3/CD19 bispezifische Antikörperkonstrukt (Blinatumomab) zur Therapie B-phänotypischer Malignome [13, 14], der Anti-EGFR-Antikörper (Cetuximab) zur Therapie des Mammakarzinoms [15] und der Anti-GD2-Antikörper (Dinituxin) zur Therapie des Neuroblastoms [12].

Die Immuntherapie und deren Kombination mit bestehenden Behandlungen wie Chemotherapie hat die Tumorforschung nachhaltig beeinflusst und die Überlebensraten signifikant verbessert [3].

Es gibt fluide Tumore und solide Tumorerkrankungen. Exemplarisch werden die B-Zell-Vorläufer akute lymphatische Leukämie (englisch *B-cell precursor ALL*, BCP-ALL), das Mantelzelllymphom, das Neuroblastom und das Mammakarzinom vorgestellt. Anschließend werden die Therapien mit *Chimeric Antigen Receptor* (CAR)-T-Zellen und Adapter CAR (AdCAR)-T-Zellen erläutert.

1.1 Hämatologische Malignome - B-phänotypische Malignome

Die maligne Transformation einer B-Zelle kann sich zu einer Leukämie oder einem Lymphom entwickeln. B-phänotypische Malignome entwickeln sich klonal aus einer mutierten Zelle und besitzen deren morphologische, immunphänotypische und molekulargenetische Charakteristika [16].

Die BCP-ALL ist eine akut lebensbedrohliche und progrediente Tumorerkrankung, die aus der Entartung einer Vorläuferzelle der B-Zelllinie hervorgeht. Am häufigsten ist die ALL im Kindesalter (80 %). Die B-lymphatischen Blasten proliferieren im Verlauf der Erkrankung exponentiell und reifen nicht mehr aus. Sie verdrängen dadurch die normale Hämatopoese im Knochenmark, werden in das periphere Blut ausgeschwemmt und infiltrieren im Verlauf andere Organe. Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie beispielsweise Hepato-/Splenomegalie, Lymphadenopathie oder B-Symptomen (Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß) kommt es durch die Verdrängung der Hämatopoese zu Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie.

Entsprechend der immunphänotypischen und molekulargenetischen Untersuchungen der Tumorzellen, dem Alter der erkrankten Person und der Anzahl der Leukozyten erfolgt eine Risikostratifizierung. Zur Therapie erfolgt immer eine systemische Chemotherapie mit intrathekaler Tumorthherapie. In klar definierten Fällen (siehe ALL-Therapieprotokolle der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studiengruppe) erfolgt eine prophylaktische oder therapeutische Bestrahlung des Zentralnervensystems (ZNS), des Mediastinums und eventuell lokaler Tumordinfiltrationen (Lymphome und/oder Chlorome). Als *ultima ratio* gibt es die allogene Stammzelltransplantation (SZT) [17].

Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit bei Kindern mit neu diagnostizierter ALL hat sich von etwa 10 % in den 1960er Jahren auf heutzutage fast 90 % verbessert [18].

Das Mantelzelllymphom ist ein niedrigmalignes, indolentes, B-zelluläres Non-Hodgkin Lymphom (B-NHL) mit rasch progredientem Verlauf. In Industriestaaten sind über 90 % der Non-Hodgkin-Lymphome B-zellulären Ursprungs [19].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 64 Jahren, wobei Männer häufiger betroffen sind. Die klinische Symptomatik besteht meist aus einer persistierenden und/oder progredienten, meist indolenten Lymphknotenvergrößerung, häufig in Kombination mit Spleno-/Hepatomegalie. Im Verlauf der Erkrankung kommt es rasch zur Dissemination der malignen B-Zellen, die mit einer ausgeprägten B-Symptomatik einhergehen kann.

Bei lokaler Erkrankung (Stadien I-II) kann eine Strahlentherapie (gegebenenfalls mit Chemotherapie) noch kurativ sein. Bei fortgeschrittener Erkrankung (Stadien III-IV) kann eine Chemotherapie oder eine palliative Immunochemotherapie mit dem Anti-CD20-Antikörper (Rituximab) [20] in Betracht gezogen werden. Weitere Therapieoptionen sind vor allem bei jüngeren Patientinnen und Patienten die autologe oder allogene SZT, teilweise in Kombination mit Rituximab. Eine Langzeitremission kann dennoch nur selten erreicht werden [21].

1.2 Solide Malignome im Kindesalter - das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste solide, extrakranielle Tumor im Säuglings- und Kindesalter. Es ist die dritthäufigste bösartige Krebserkrankung im Kindesalter nach Leukämie und Hirntumoren [22]. Der Tumor entsteht aus embryonalen Zellen des sympathischen Nervensystems, das unwillkürliche Grundfunktionen wie Atmung, Herz- und Kreislauf sowie Darm- und Blasentätigkeit steuert. Die fehlerhafte Entwicklung der sympathischen Zellen beginnt wahrscheinlich noch vor der Geburt und kann durch Mutationen oder Chromosomenfehler entstehen [23]. Am häufigsten entsteht die Tumorerkrankung im Nebennierenmark und auf verschiedenen Ebenen der Grenzstränge des Rückenmarks [22].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 17 Monaten [24]. 50 bis 60 % der Erkrankten besitzen bei Diagnosestellung bereits Metastasen [25].

Screenings zur Früherkennung existieren nicht. In den meisten Fällen treten keine Frühsymptome auf, Beschwerden entstehen erst durch fortschreitendes Tumorwachstum (zum Beispiel Horner-Syndrom) oder Metastasen (zum Beispiel Blutergüsse um die Augen, sogenannte Brillenhämatome oder Monokelhämatome) [22]. Zur Diagnosestellung werden neben bildgebenden Verfahren auch Blut- und Urinuntersuchungen durchgeführt. Dabei werden Tumormarker bestimmt, also Substanzen, die durch die Tumorerkrankung im Körper erhöht sein können. Beim Neuroblastom sind beispielsweise die Abbauprodukte der Katecholamine (zum Beispiel Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure) und die neuronenspezifische Enolase [26] erhöht. Bei der Methyliodbenzylguanidin (MIBG)-Szintigraphie wird die radioaktiv markierte Substanz MIBG intravenös verabreicht. Sie reichert sich vor allem in Neuroblastomzellen an, sodass die radioaktive Strahlung durch die spezifische Aufnahme des Radiopharmakons im Primärtumor und den Metastasen registriert werden kann. Nach der endgültigen Diagnosestellung über eine Biopsie steht die möglichst organerhaltende operative Entfernung von Primärtumor und Metastasen im Vordergrund. Bei fehlender Operabilität werden systemische Therapieverfahren wie Radionuklidtherapie mit MIBG und Chemotherapie sowie die autologe Stammzelltransplantation nach Hochdosischemotherapie eingesetzt. Das Tumorstadium, die molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors und das Alter der erkrankten Person beeinflussen die Prognose [22].

1.3 Solide Malignome im Erwachsenenalter - das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau [27]. Es gibt zahlreiche endogene und exogene Risikofaktoren. Zu den endogenen Faktoren gehören zum Beispiel eine frühe Menarche, späte Menopause, Kinderlosigkeit [28] oder die Brustkrebs (englisch *breast cancer*, BRCA) 1/2 Mutation [29, 30]. Zu den exogenen Risikofaktoren zählen eine langjährige Hormonersatztherapie oder eine orale Kontrazeption [31]. Die Subtypen des Mammakarzinoms werden immunhistochemisch charakterisiert durch Östrogen- und Progesteronrezeptoren, den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (englisch *human epidermal growth factor receptor*, HER) 2 oder Proliferationsmarker (zum Beispiel Ki-67).

Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen beträgt 65 Jahre [27].

Der Tumor entwickelt sich aus einer präkanzerösen Veränderung, dem *Carcinoma in situ* (CIS) in der Brust und kann bei präventiven Untersuchungen frühzeitig erkannt und kurativ entfernt werden.

Die Auswahl des Therapieverfahrens bei invasivem Karzinom ist abhängig von den Risikofaktoren, dem Alter der erkrankten Person, der Tumorgroße, der vaskulären und lymphatischen Tumordissemination, dem klinischen und onkologischen *Grading*, dem Hormonrezeptorstatus, dem HER2-Status und Proliferationsstatus. Zur interdisziplinären Behandlung gehören die operative und endokrine Therapie sowie die Chemo- und Radiotherapie. Standard ist die brusterhaltende Entfernung des Tumors in Kombination mit postoperativer Bestrahlung. Bei R0-Status nach Operation (kein mikroskopischer Tumorrest nachweisbar) kann durch eine engmaschige Nachsorge eine nahezu normale Lebenserwartung erreicht werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland 78 % [27].

Zwischen den beschriebenen Tumorerkrankungen besteht kein Zusammenhang. Es soll im Rahmen dieser Doktorarbeit die universelle Anwendbarkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie bei allen Tumorerkrankungen gezeigt werden.

1.4 Potenzielle Zielstrukturen der AdCAR-T-Zell-Therapie

In der potenziellen klinischen Anwendung von AdCAR-T-Zellen soll bei den erkrankten Personen ein individuelles Antigenescreening des Tumors erfolgen (Screeningplattform für individuelles *Immunotargeting*, SPIIT) und dadurch eine patientenspezifische Tumorthherapie ermöglicht werden. Immuntherapien haben das Potential, Nebenwirkungen und Sekundärschäden durch Chemotherapie, Radiopharmakotherapie und Bestrahlung drastisch zu senken.

1.4.1 Antigene von B-phänotypischen Malignomen

Die maligne Entartung lymphatischer Zellen kann auf allen Ebenen der physiologischen Zelldifferenzierung erfolgen. Charakteristisch für eine maligne Entartung ist der aberrante Immunphänotyp, bei dem neben dem Antigenexpressionsprofil des Reifungsstadiums der mutierten Zelle (siehe Tabelle 1.1) Stammzell-assoziierte Marker

exprimiert werden. Frühe B-Vorläuferzellen besitzen beispielsweise noch kein CD20. Das B-Mantelzelllymphom ist dagegen CD20-positiv [20].

Tabelle 1.1: Immunphänotypen der B-Zell-Entwicklungsstadien

Darstellung der Stadien der physiologischen B-Zell-Entwicklung mit den jeweiligen Antigenexpressionen (rot) und den daraus resultierenden Neoplasien. Gesunde B-Zellen exprimieren CD19, CD22 und CD79 ab dem Pro-B-Zell-Stadium [32-35] sowie CD20 und CD37 ab dem Prä-B-Zell-Stadium bis zur Differenzierung zu Plasmazellen [26, 36, 37]. Frühe B-Zell-Vorläuferstadien sind CD10- und ROR-1-positiv [26, 38]. Plasmazellen sind CD138- [39] und schwach CD19-positiv (hellrot) [40].

Immunphänotypen der B-Zell-Entwicklungsstadien					
	Pro-B-Zelle	Prä-B-Zelle	Unreife B-Zelle	Reife B-Zelle	Plasmazelle
CD19					
CD10					
CD138					
CD22					
ROR-1					
CD20					
CD79					
CD37					
Neoplasien	B-Zell-Vorläufer (BCP)- Leukämie/-Lymphom		Reifzellige B-Zell-Lymphome		Myelom

1.4.1.1 CD19

CD19 ist ein Biomarker für alle gesunden und neoplastischen B-Zellen ab dem Pro-B-Zell-Stadium sowie für folliculäre dendritische Zellen. Während der terminalen Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen kommt es zum Verlust des Antigens [32]. CD19 ist ein transmembranes Glykoprotein vom Typ I [32]. Es ist maßgeblich an der intrinsischen Aktivierung von B-Zellen, sowohl B-Zell-Rezeptor (englisch *B-cell receptor*, BCR)-abhängig als auch -unabhängig, beteiligt [41, 42] und für die Signalübertragung über den Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch *major histocompatibility complex*, MHC)-II erforderlich [43]. Zusätzlich wird über CD19 die BCR-induzierte Signalkette, die für die B-Zell-Expansion entscheidend ist, verstärkt [44]. Dadurch spielt CD19 die entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des

Gleichgewichts zwischen humoraler, antigeninduzierter B-Zell-Antwort und Toleranzinduktion. Für eine B-Zell vermittelte Immunantwort ist CD19 unabdingbar. Aus den genannten Gründen geht hervor, dass CD19 ein sehr guter Angriffspunkt bei der Therapie von Lymphomen, Leukämien und Autoimmunerkrankungen darstellt.

Antigene der BCP-ALL

1.4.1.2 CD10

CD10 (Nepilysin) ist ein Zelloberflächen-Ektoenzym, das an der Regulation der Angiogenese, Zellproliferation und -migration beteiligt ist. Frühe lymphatische Vorläufer-B-Zellen sind CD10-positiv, während reife B-Zellen CD10-negativ sind. Die CD10-Expression ist bei kindlichen Leukämien früher B-Zell-Reifestadien häufig hochreguliert. Bei der BCP-ALL wird CD10 als tumorspezifisches Antigen verwendet und dient der Abgrenzung von anderen hämatologischen Erkrankungen der B-Zell-Linie. Des Weiteren wird CD10 auf Zellen der Prostata, der Niere und Nebenniere, der Lunge, des Darms und des Endometriums exprimiert [38].

CD10 ist ein transmembranes Glykoprotein vom Typ II [45]. Die extrazelluläre Domäne besitzt eine katalytische Aktivität und inaktiviert Neuropeptide wie Bradykinin, Oxytocin, atriales natriuretisches Peptid, Neurotensin, Substanz P und Endothelin-1. Eine Herabregulierung oder der Verlust von CD10 (zum Beispiel durch Methylierung des Promoters) führt zur vermehrten Ansammlung von Neuropeptiden, die zur Proliferation von undifferenzierten Zellen und dadurch zur Tumorprogression führt. Außerdem hemmt CD10 physiologisch die Zellmigration [38]. CD10 wirkt demnach als Tumorsuppressor und verhindert die Tumorentstehung. Bei anderen Tumorarten wie dem Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (englisch *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), dem Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (englisch *esophageal squamous cell carcinoma*, ESCC) oder dem kolorektalem Karzinom wirkt CD10 tumorprogressiv [46-48].

Eine hochregulierte Expression geht oft mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Schweregrad sowie einer schlechteren Prognose einher. CD10 eignet sich daher als Angriffspunkt für die klinische Intervention und Medikamentenentwicklung.

1.4.1.3 CD138

CD138 (englisch *Syndecan-1*) ist ein transmembranes Proteoglykan vom Typ I [49]. Es wird beispielsweise auf den gesunden Plattenepithelzellen verschiedener Organe, den Becherzellen des Gastrointestinaltrakts und den Hepatozyten exprimiert [50]. Es ist an der Wundheilung [51], Zelladhäsion [52], Endozytose [53] und Translokation zum Zellkern [54] beteiligt. Zahlreiche Proteine wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren können an die Ektodomäne von CD138 binden [55]. Im Reifeprozess der B-Zellen variiert die Expression von CD138 zwischen Erwachsenen und Neugeborenen stark. B-Zellen des adulten Knochenmarks sind zu über 70 % CD138-positiv, während weniger als 10 % der B-Zellen des neonatalen Knochenmarks und der Niere CD138 exprimieren [39]. Plasmazellen exprimieren am meisten CD138, in der Regel das zehnfache von heranreifenden B-Zellen [39].

1.4.1.4 CD22

CD22 (englisch *Siglec-2*) ist ein Glykoprotein [56] und gehört zur Familie der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Lektine (englisch *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin*, Siglec). B-Zellen exprimieren CD22 nach dem Erwerb von IgM bis zum Stadium reifer B-Zellen [33, 34]. Plasmazellen sind CD22-negativ. CD22 wird auf fast allen BCP-ALL Typen exprimiert [57] und reguliert die BCR-induzierte B-Zell-Aktivierung [58]. Außerdem dient CD22 als Adhäsionsmolekül und kann zahlreiche Glykoproteine über Sialinsäuren binden. Es ist beteiligt an der B-Zell-Aggregation und Bindung an T-Zellen, Monozyten und Erythrozyten [59-61]. CD22 moduliert auf diese Weise möglicherweise die T-Zellen-abhängige B-Zell-Aktivierung reifer B-Zellen [60].

Antigene des Mantelzelllymphoms (B-NHL)

1.4.1.5 ROR-1

ROR-1 (englisch *tyrosine kinase-like orphan receptor 1*) wird auf undifferenzierten embryonalen Stammzellen, Zellen der B-zellulären chronisch lymphatischen Leukämie und des Mantelzelllymphoms stark exprimiert [26]. Der Mechanismus, der Zeitpunkt und die Rolle der ROR-1-Expression bei der malignen Transformation der B-Zellen sind

unklar. Die durch ROR-1 induzierten Signalwege (zum Beispiel der Wnt-Signalweg) sichern das Überleben von malignen Zellen, einschließlich solider Tumore [62].

Abgesehen von einer niedrigen Expression im Fett-, Lungen- und Pankreasgewebe sowie in frühen Stadien der B-Zell-Reifung sind die meisten adulten Organe und reifen Blutzellen ROR-1-negativ [26]. Aus diesem Grund könnte ROR-1 als Angriffspunkt bei der Tumorthherapie (zum Beispiel AdCAR-T-Zell-Therapie) dienen und die gesunden adulten Plasmazellen und B-Gedächtniszellen aussparen [26].

1.4.1.6 CD20

CD20 wird auf B-Zellen vom Prä-B-Zell-Stadium bis zu den B-Gedächtniszellen exprimiert [26]. CD20 ist ein membranständiges Integralprotein, das die B-Zell-Aktivierung reguliert und in ruhenden sowie aktivierten Zellen unterschiedlich phosphoryliert ist [63]. Durch die B-Zell-Aktivierung und proliferative Stimuli nimmt die Phosphorylierung von CD20 zu und aktiviert wiederum weitere Proteinkinasen [63]. CD20 wird bei der BCP-ALL unterschiedlich stark, jedoch insgesamt eher gering exprimiert [64].

1.4.1.7 CD79

CD79 setzt sich aus CD79a und CD79b zusammen. Es ist ein integrales Membranprotein, das auf B-Zellen vom frühen B-Zell-Reifestadium [65] bis zur Differenzierung zu Plasmazellen exprimiert wird [35, 66]. Unter physiologischen Bedingungen bildet CD79a mit CD79b über Disulfidbrücken ein Heterodimer [67], das mit membrangebundenem IgM den B-Zell-Rezeptor-Signalkomplex formt [68]. Nach der Antigen-Bindung an den BCR induziert das Dimer die B-Zell-Aktivierung. Die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Kinasen führen zur Reorganisation des Zytoskeletts und Veränderungen der Genexpression in B-Zellen [67]. CD79 ist daher essenziell für das Ausreifen und Überleben der B-Zellen [69, 70]. CD79 eignet sich als B-Zell-Tumormarker von Vorläufer-B-Zell-Neoplasien und CD20-negativen B-Zell-Neoplasien.

1.4.1.8 CD37

CD37 (Tetraspanin, TSPAN26) wird auf B-Zellen vom Prä-B-Zell-Stadium bis zur Differenzierung zu Plasmazellen exprimiert. T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen sind

nur gering CD37-positiv [36, 37]. CD37 gehört zur Familie der Tetraspanine. Sie gelten als molekulare Vermittler der Signaltransduktion, die an vielfältigen Prozessen wie Zellproliferation und -überleben oder Apoptose, Zelladhäsion, -transport sowie interzellulärer Kommunikation über Exosome, Metastasen und Immunreaktionen beteiligt sind [37]. Außerdem ist CD37 relevant für die T-Zell-B-Zell-Interaktion, die Immunglobulin G (IgG)-/Immunglobulin A (IgA)-Produktion und das Gleichgewicht zwischen Immunreaktion und -toleranz. Im CD37-negativen Mausmodell und in einer Studie mit diffus großzelligem B-Zell Lymphom (englisch *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CD37 zu einem schlechteren klinischen *Outcome* und zu einer schlechteren Prognose führt [71].

Aufgrund der relativ selektiven Expression von CD37 auf B-Zellen könnte CD37 als therapeutischer Angriffspunkt dienen.

1.4.2 Antigene des Neuroblastoms

1.4.2.1 GD2

Das Disialogangliosid (GD2/Ch14.18) wird auf Neuronen, Hautmelanozyten, peripheren Schmerzfasern und Zellen neuroektodermaler Herkunft exprimiert [72]. Tumore wie Neuroblastome, Melanome, Gewebesarkome, Osteosarkome und kleinzellige Lungenkarzinome weisen eine heterogene GD2-Expression auf [73, 74].

Patienten mit Neuroblastom weisen signifikant höhere Werte an freiem GD2 im Blut auf [74]. GD2 eignet sich daher zur Diagnosestellung und als Angriffspunkt einer Immuntherapie bei Neuroblastomen, wobei lösliches GD2 auch therapeutisch eingesetzte Anti-GD2-mAb abfangen könnte. Da die GD2-Antikörpertherapie in hohen Dosen mit beispielsweise 100 mg/m² Körperoberfläche durchgeführt wird, spielt *Antigen shedding* vermutlich eine untergeordnete Rolle [75].

Nebenwirkungen der monoklonalen Anti-GD2-Antikörpertherapie sind beispielsweise Fieber, Tachykardie und schwere neuropathische Schmerzen. Die Immunaktivierung erfolgt über verschiedene Mechanismen. Einerseits ist der mAb in der Lage, Immunzellen für die ADCC zu rekrutieren, andererseits fixiert er Komplement.

Die Reaktion kann bis hin zur Anaphylaxie reichen. Der neuropathische Schmerz entsteht vermutlich durch die Interaktion der Anti-GD2-mAb mit peripheren Nervenfasern durch

Komplementaktivierung [76-78]. Die humanisierte Version des Anti-GD2-mAb hu14.18 weist ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsprofil auf [79].

1.4.2.2 CD276

CD276 (B7-H3) kommt in zahlreichen Zell- und Gewebetypen hauptsächlich in löslicher Form als mRNA im Zytoplasma vor, während dessen Expression als Transmembranprotein begrenzt ist [80]. Membrangebundenes CD276 wird bei vielen soliden Tumoren stark überexprimiert und korreliert mit einer schlechten Prognose und einem schlechteren klinischen *Outcome* [80-82]. Durch die Überexpression eignet es sich besonders als Zielantigen in der Tumorthherapie.

Die Rolle von CD276 bei der Kontrolle der angeborenen und erworbenen Immunität ist sehr komplex und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Neuroblastomzellen exprimieren CD276, um sich vor NK-Zell-vermittelter Lyse zu schützen [82].

CD276 hemmt die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Zytokinproduktion (Interferon- γ und IL-2) bei Mäusen und Menschen [83].

Zusätzlich exprimiert der heranreifende Knochen während der Embryogenese CD276. Eine Inhibition von CD276 schränkte *in vitro* die Knochenbildung durch Osteoblasten und die Knochenmineralisierung ein. Im Mausmodell wiesen CD276 Knockout (KO)-Mäuse zwar keine relevanten Skelettanomalien, jedoch eine geringere Knochenmineraldichte in kortikalen Knochen auf [84].

Des Weiteren ist CD276 an der Modulation von Tumorzellmigration, -invasion und -adhäsion beteiligt [85]. Im Rahmen von Immun-Checkpoint-Inhibitoren könnten Antikörper gegen CD276 vielversprechend sein. In Kombination mit einem Chemotherapeutikum oder anderen Immuntherapien kann das Blockieren des Antigens zu synergistischen Anti-Tumor-Effekten führen [80].

1.4.2.3 CD171

CD171 (L1- *cell adhesion molecule* (CAM)) ist ein membranständiges Glykoprotein vom Typ I und gehört zur Familie der Ig [86]. CD171 spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung bei der Myelinisierung, der axonalen Führung und der Migration von Körnerzellen der Kleinhirnrinde [87-89]. CD171-Mutationen führen zu verschiedenen Anomalien wie mentale Retardierung und Veränderungen des ZNS, die

als CRASH-Syndrom (Corpus Callosum Hypoplasie, Retardierung, adduzierte Daumen, spastische Paraplegie und Hydrozephalus) bezeichnet werden [86, 90]. Des Weiteren ist CD171 für die Morphogenese der Nieren [91] und Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen [92] relevant. Neuroblastome exprimieren reichlich und meist zu 100 % CD171 sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran [93]. Daher eignet sich CD171 als Tumormarker zur Diagnose und als Angriffspunkt der Therapie von Neuroblastomen. Im Gegensatz zu vielen adulten Tumoren, bei denen CD171 mit einem aggressiven Verlauf und einem schlechteren klinischen *Outcome* korreliert, zeigen kindliche CD171-positive Neuroblastome einen guten klinischen Verlauf [94].

1.4.2.4 CD81

CD81 (TAPA1) ist ein transmembranes Protein vom Typ III und wird auf Zellen hämatopoetischer Herkunft sowie Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Es ist beteiligt an Zellwachstum und Signaltransduktion [95].

1.4.2.5 CD117

CD117 (c-Kit) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor vom Typ III [96]. CD117 wird auf zahlreichen Tumoren wie gastrointestinalen Stromatumoren, Keimzelltumoren, Leukämien, malignen Transformationen von Mastzellen, Brust-Adenokarzinomen, malignen Melanomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen exprimiert. CD117-Deregulationen wie Überexpression oder *gain of function*-Mutationen sind vermutlich nicht ausreichend für eine Tumorentstehung, spielen aber eine entscheidende Rolle beim Auftreten und bei der Progression von Tumoren [97].

Zusätzlich wird CD117 auf zahlreichen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert [98]. Die Expression verringert sich im Verlauf der Zelldifferenzierung [99]. Es gibt Hinweise darauf, dass CD117 ein Rezeptor für Stammzelloktoren ist [100, 101]. Er spielt daher eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Differenzierung von Stammzellen [102]. Aus diesem Grund führt eine *loss of function*-Mutation zu vielen unterschiedlichen, weitreichenden Defekten im hämatopoetischen System [103], aber auch zu Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit, Homöostase, Melanogenese und das Nervensystem [104, 105].

Jüngere Studien stellen CD117 als Protoonkogen dar [106]. Kinase-Inhibitoren wie Imatinib, die CD117 als Angriffspunkt haben, stellen eine vielversprechende Therapie dar. Allerdings mutiert CD117 häufig und wird außerdem in gesunden Geweben wie Brustepithel, vaskulärem Endothel, Schweißdrüsen und retinären Astrozyten exprimiert [99]. CD117 eignet sich in der molekularen Therapie als Angriffspunkt, wenn eine Treibermutation vorliegt. Für zielgerichtete Immuntherapien gilt dies nicht, da lediglich die Überexpression des Zielantigens für die Wirksamkeit der Therapie verantwortlich ist.

1.4.3 Antigene des Mammakarzinoms

1.4.3.1 EGFR

Der epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (englisch *epidermal growth factor receptor*, EGFR) ist ein transmembranes Glykoprotein. In vielen malignen Tumoren ist der Rezeptor überexprimiert oder konstitutiv aktiviert - beispielsweise in Tumoren der Brust, des Ösophagus, des Kolorektums, des Pankreas sowie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (englisch *non-small cell lung carcinoma*, NSCLC) und HNSCC. Etwa 50 % der dreifach negativen (englisch *triple-negative breast cancer*, TNBC) und inflammatorischen Brusttumore (englisch *inflammatory breast cancer*, IBC) weisen eine erhöhte EGFR-Expression auf [107].

Die Bindung von EGFR aktiviert komplexe Signalkaskaden, die Wachstum, Angiogenese, Signalweiterleitung, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Überleben von Tumorzellen modulieren [108, 109]. Zusätzlich kann über EGFR die Synthese und Sekretion von angiogenen Faktoren, wie beispielsweise des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (englisch *vascular endothelial growth factor*, VEGF), IL-8 und des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (englisch *basic fibroblast growth factor*, bFGF) stimuliert werden [110]. Daher eignet sich EGFR als Angriffspunkt in der Tumorthherapie. Um die Effizienz der Monotherapie zu erhöhen, werden EGFR-Inhibitoren mit Chemotherapie oder Radiotherapie kombiniert [111].

1.4.3.2 CD47

CD47 ist ein weit verbreitetes transmembranes Glykoprotein und unterdrückt die Phagozytose durch Immunzellen über ein sogenanntes *don't eat me*-Signal [112]. Eine erniedrigte Expression von CD47 erhöht die Aussortierung von roten Blutzellen [113]

und Thrombozyten [114] durch Makrophagen in der Milz. Dies kann zu hämolytischer Anämie und idiopathischer thrombozytopenischer Purpura führen. Hämatopoetische Stammzellen regulieren vor und während einer Mobilisierung die Expression von CD47 hoch, um der Phagozytose durch Makrophagen zu entgehen [115].

Über CD47 können Tumorzellen Angriffen des Immunsystems entgehen. Eine CD47-Überexpression ist mit schlechter Prognose bei Brustkrebs, Leukämie [116], Non-Hodgkin-Lymphom [117], Blasenkrebs [118] und anderen soliden Tumoren [119] assoziiert. Bei immunkompetenten Mäusen führt eine Anti-CD47-Therapie zu einer effektiven Anti-Tumor-Wirkung ohne gravierende Toxizität auf gesunde Zellen, jedoch zu einer transienten Anämie [119].

1.4.3.3 ROR-1

siehe Kapitel 1.4.1.5

1.4.3.4 CD276

siehe Kapitel 1.4.2.2

1.5 CAR-T-Zellen

T-Zellen können, im Gegensatz zu B-Zellen, körperfremde oder mutierte Proteinsequenzen nur erkennen, wenn diese über MHC-Moleküle präsentiert werden [120]. Jede kernhaltige Körperzelle präsentiert über MHC intrazellulär prozessierte Peptide, die von körpereigenen, körperfremden, pathogenen oder entarteten Zellstrukturen abstammen. T-Zellen erkennen diese über ihren T-Zell-Rezeptor (englisch *T-cell receptor*, TCR), werden aktiviert und lysieren selektiv entsprechende Zielzellen oder sezernieren proinflammatorische Zytokine. Die Lyse wird durch die Freisetzung von Zytokinen und des zytotoxischen Proteins Perforin, das die Zellmembran der Zielzelle für Granzyme durchlässig macht sowie über die Bindung eines Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor induziert. Die Apoptose der Zielzelle erfolgt durch die Aktivierung von intrazellulären Caspasen [121].

Die Immuntherapie bei Tumorerkrankungen nutzt diesen Mechanismus beispielsweise beim Einsatz von genetisch veränderten T-Zellen, deren TCR spezifisch gegen ein bestimmtes Tumorantigen gerichtet ist [122]. Dieses Prinzip funktioniert allerdings nur,

wenn die Tumorzellen Zielstrukturen über MHC präsentieren. Durch Mechanismen der Immunevasion wie beispielsweise eine Herunterregulierung der MHC-Proteine können Tumorzellen der Lyse durch T-Zellen entgehen [123]. 1989 wurden von Gross *et al.* die ersten genetisch veränderten T-Zellen mit einem MHC-unabhängigen chimären TCR entworfen, der eine Kombination von TCR und mAb darstellt und dem ersten CAR entspricht [124].

Der Einsatz der CAR-T-Zellen in der Tumorthherapie stellt heutzutage eine erfolgsversprechende Alternative zu herkömmlichen Therapien dar.

Prinzipiell besteht ein CAR in den meisten Fällen aus einer extrazellulären, einkettigen Antigenbindungsdomäne, abgeleitet von einem mAb (englisch *single-chain variable fragment*, scFv), welche die spezifische Antigenbindung des CAR ermöglicht, einer Transmembrandomäne (zum Beispiel CD8, CD4 oder CD28) und der intrazellulären Signaldomäne des TCR (siehe Abbildung 1.1). Über Letztere wird die T-Zell-Aktivierung und konsekutiv die Effektorfunktion, das heißt die Zytotoxizität und Zytokinproduktion vermittelt. Der Abstand zwischen scFv und Transmembrandomäne wird durch einen Platzhalter (englisch *spacer*) variiert.

CAR-T-Zellen binden daher MHC-unabhängig an spezifische Oberflächenmoleküle von Zellen (zum Beispiel CD19) und induzieren deren Lyse.

In den modernen CAR-Konstrukten sind zusätzlich intrazelluläre, kostimulierende Domänen (zum Beispiel 4-1 BB, CD28 oder OX-40) an die CD3- ζ Kette des TCR gebunden.

Die Aktivierung der T-Zelle erfolgt physiologisch über die Phosphorylierung der CD3- ζ Kette [125, 126]. Die CAR-T-Zellen der ersten Generation besitzen lediglich die CD3- ζ Kette zur Induktion der intrazellulären Signalkaskade und Lyse der Target-Zelle. Erst die zusätzlichen intrazellulären, kostimulierenden Domänen in CAR-T-Zellen der zweiten und dritten Generation verstärken die Signalkaskade und ermöglichen eine anhaltende Aktivität, Proliferation und Persistenz der CAR-T-Zellen [127].

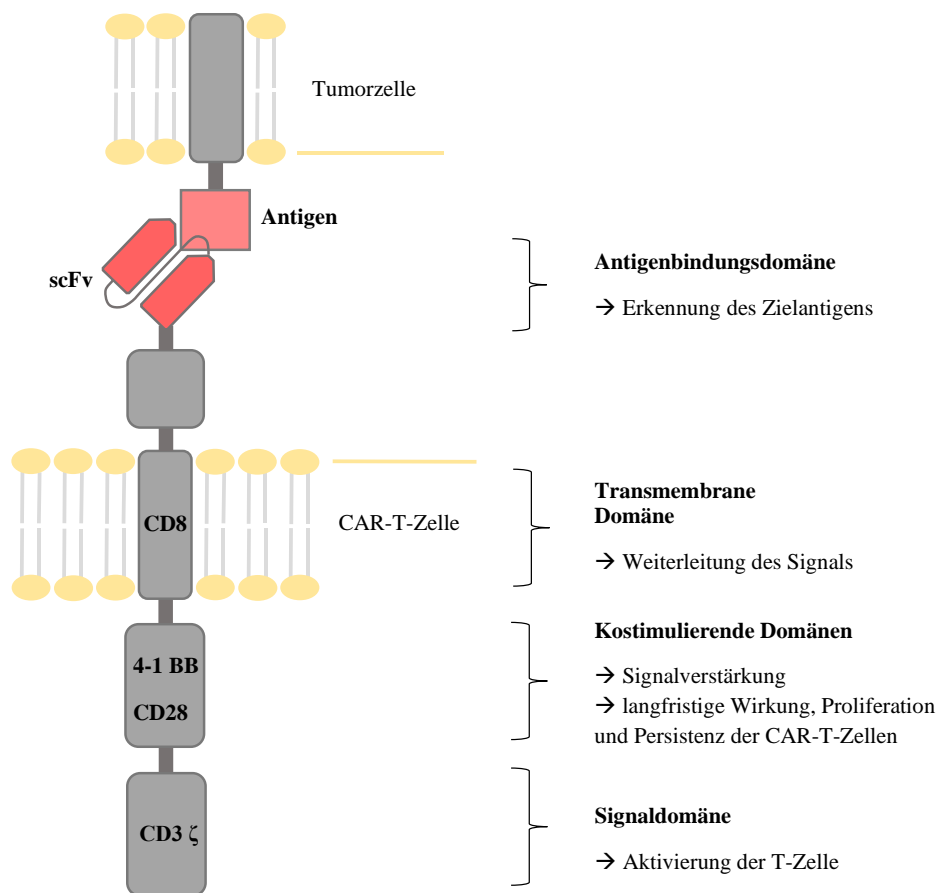


Abbildung 1.1: Aufbau eines CAR

Der *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) besteht aus einer extrazellulären Antigenbindungsdomäne (scFv), einer Transmembranedomäne, intrazellulären kostimulierenden Domänen (seit der zweiten CAR-Generation) und einer Signaldomäne (CD3- ζ Kette des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplexes). Der Abstand zwischen scFv und der Transmembranedomäne kann durch einen Platzhalter (englisch *spacer*) variieren.

Zur Herstellung der CAR-T-Zellen werden T-Zellen aus dem Vollblut der erkrankten Person isoliert. Mit Hilfe eines Virus (Retro-/Lenti- oder Adenovirus) kann eine synthetische Gensequenz in das Genom der T-Zellen integriert werden, sodass diese einen artifiziellen Immunrezeptor, den CAR, auf der Zelloberfläche exprimieren.

Die extrazelluläre Antigenbindungsdomäne (scFv) kann für jedes beliebige Tumorantigen als Zielstruktur (englisch *target*) konstruiert werden und ist MHC-unabhängig. Die Wirksamkeit und Effektivität der CAR-T-Zell-Therapie gegen B-phänotypische Antigene konnten in klinischen Studien bestätigt werden und bieten große Chancen. Bei stark vorbehandelten Patientinnen und Patienten mit BCP-ALL [128-

132] und B-NHL [133-135] konnte bei 53 bis 93 % eine vollständige Remission erreicht werden. Im Jahr 2017 kam es daher in den USA zu einer Zulassung von Anti-CD19 spezifischen CAR-T-Zellen als Therapeutikum bei rezidivierter BCP-ALL und DLBCL durch die *food and drug administration* (FDA) [134, 136].

Beim Einsatz in einem breiten Indikationsspektrum zeigen sich jedoch Risiken der konventionellen CAR-T-Zellen. Sie können nur zwischen Antigenexpression (*on-signal*) und keiner Antigenexpression (*off-signal*) unterscheiden. Daraus ergibt sich folgende Problematik:

1. Zu Beginn der Therapie kommt es nach dem ersten Antigenkontakt zu einer massiven und unkontrollierten Expansion der CAR-T-Zellen. Folgen sind unter anderem das lebensbedrohliche Zytokin-Freisetzungssyndrom (englisch *cytokine release syndrome*, CRS) und eine teils letale, nicht-behandelbare Neurotoxizität [137-140]. Eine toxische Wirkung auf die Hämatopoese zeigt sich in einer Zytopenie (Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie) [141]. Dadurch können Blutungskomplikationen, aber auch Infektionen durch Bakterien oder Pilze entstehen. Diese Folgen sind im klinischen Einsatz nur schwer kontrollierbar.

2. Nach erfolgreichem *Engraftment* (deutsch anwachsen) lysieren die CAR-T-Zellen potenziell lebenslang alle Zielantigen-positiven Zellen [142]. Dies ist aufgrund der fehlenden Tumorspezifität toxisch für alle gesunden Gewebe, die das Zielantigen ebenfalls exprimieren (sogenannte *on target, off tumor*-Toxizität). Es können lebensbedrohliche Situationen entstehen, wenn das Antigen auf lebenswichtigem, gesundem Gewebe exprimiert wird [136].

3. Die kontinuierliche Stimulation führt zur Erschöpfung der CAR-T-Zellen und begrenzt ihre Effizienz [143]. Resultate sind ein zeitlich begrenztes Therapieansprechen und im Verlauf auftretende Rezidive, wenn die CAR-T-Zellen wieder verloren gehen.

4. Die monovalente CAR-T-Zell-Therapie führt zu einem starken evolutionären Selektionsdruck auf den Tumor. Immunevasion durch Verlust der Zielantigenstruktur auf Basis einer Antigenmutation (selten, aber theoretisch möglich), Herunterregulation des Antigens, alternatives *Splicing* (regelmäßig beobachtetes Phänomen bei CD19 [144]) mit Verlust des Zielepitops durch alternative intrazelluläre Prozessierung des Zielantigens und/oder Veränderung des Genexpressionsprofil sind Hauptursachen für das

Therapieversagen der CAR-T-Zell-Therapie [128, 144-147]. In klinischen Verlaufsstudien wurden bei 10 bis 50 % der Fälle Rezidive beobachtet [144, 147]. Die therapierefraktären Fälle haben bisher eine sehr schlechte Prognose. Eine Lösung könnte der Wechsel des Zielantigens und vielmehr noch das synchrone, kombinatorische *Targeting* mehrerer Zielantigene [128, 146, 147] beispielsweise durch den Einsatz mehrerer CAR-T-Zellen unterschiedlicher Spezifität oder durch den Einsatz von AdCAR-T-Zellen sein.

1.6 AdCAR-T-Zellen

Die Therapie mit AdCAR-T-Zellen könnte zahlreiche bestehende Probleme der CAR-T-Zell-Therapie überwinden und stellt dadurch eine vielversprechende Strategie in der Immuntherapie dar.

Im AdCAR-T-Zell-System erfolgt die T-Zell-Aktivierung und Lyse der Target-Zellen in einem zweistufigen Prozess (siehe Abbildung 1.2). Zunächst binden Adaptermoleküle (AM) an die entsprechenden Antigene der Target-Zellen. Daraufhin binden die AdCAR-T-Zellen an die AM. Dadurch wird die Antigenerkennung funktionell von der Aktivierung der T-Zelle getrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden biotinylierte mAb als AM verwendet. Das nicht-physiologische Biotin Bio3 (englisch *label*) ist über ein Verbindungsstück (englisch *linker*) an die konstante Region des AM gebunden. Die AM umfassen daher eine Antigen-bindende Domäne, eine Linker-Domäne und eine Markierungsdomäne (Label) aus Biotin. Die AdCAR-T-Zellen sind gegen das sogenannte *Linker-Label-Epitope* (LLE) gerichtet. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen wurde das Antikörperfragment mBio3-scFv auf das CAR-Konstrukt der zweiten und dritten Generation übertragen.

Die AM übertragen die Antigenerkennung über das LLE und den CAR in eine T-Zell-Aktivierung und die Lyse der Target-Zelle.

Zum durchflusszytometrischen (FC)-Nachweis und zur Anreicherung von AdCAR-T-Zellen dient der niedrig-affine Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (englisch *low-affinity nerv growth factor receptor*, LNGFR), der mit dem AdCAR koexprimiert wird.

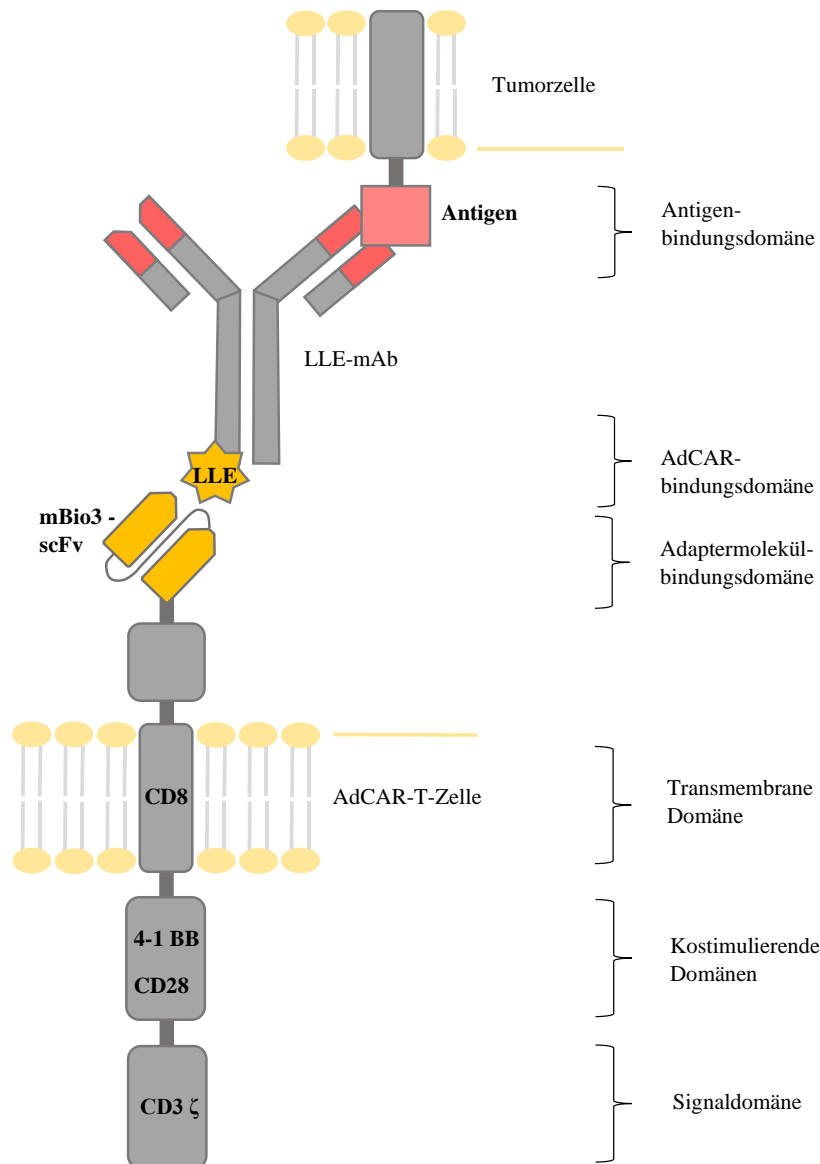


Abbildung 1.2: Aufbau eines AdCAR und eines Adaptermoleküls

Das Adaptermolekül (LLE-mAb) besteht aus der Antigenbindungsdomäne eines monoklonalen Antikörpers (mAb) und dem *Linker-Label-Epitope* (LLE) aus nicht-physiologischem Biotin (Bio3) und *Linker*. Die extrazelluläre Adaptermolekülbindungsdomäne (mBio3-scFv) des AdCAR ist gegen das LLE gerichtet. Der AdCAR bindet indirekt über LLE-mAb an das Zielantigen der Tumorzelle.

Die Therapie mit AdCAR-T-Zellen weist folgende Vorteile auf:

1. Die AdCAR-T-Zell-Therapie unterscheidet sich von der CAR-T-Zell-Therapie durch ihre An- und Abschaltbarkeit, die durch LLE-mAb als AM ermöglicht werden (siehe Abbildung 1.3). Im Falle einer gravierenden Nebenwirkung der Therapie könnte die Gabe der LLE-mAb beendet und damit weitere Folgen wie beispielsweise Organversagen und eine lebensbedrohliche Aktivierung des Immunsystems verhindert werden. Gleichzeitig

können die persistierenden AdCAR-T-Zellen im Falle eines Tumorrezidivs durch Zugabe von LLE-mAb reaktiviert werden.

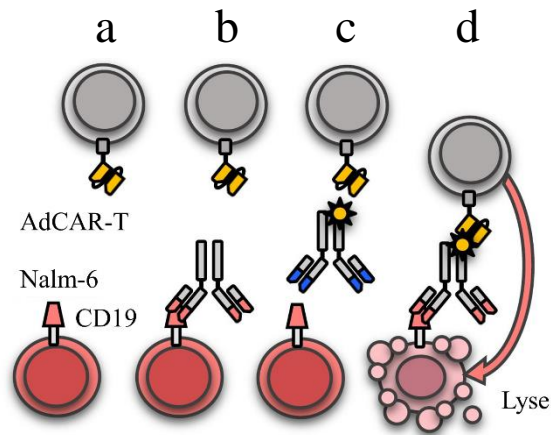


Abbildung 1.3: Darstellung der AdCAR-T-Zellen-vermittelten Tumorlyse

Die AdCAR-T-Zelle ist grau und die Tumorzelle der Zelllinie Nalm-6 mit Zielantigen CD19 ist rot dargestellt. Nur in Anwesenheit eines Zielantigen-spezifischen LLE-CD19 mAb wird die AdCAR-T-Zelle aktiviert und induziert die Lyse der Tumorzelle (d). In Abwesenheit eines Adaptermolekuls (a), in Abwesenheit eines mAb ohne LLE (b) oder eines nicht Zielantigen-spezifischen LLE-mAb (c) wird die AdCAR-T-Zelle nicht aktiviert.

(Adaptiert aus [168])

2. Im Falle eines Antigenverlusts der Tumorzellen kann durch den Einsatz eines LLE-mAb alternativer Spezifität ein neues Zielantigen adressiert werden [148]. Außerdem ist durch eine variable Kombinationstherapie von LLE-mAb ein synchrones und sequenzielles *Targeting* und dadurch eine spezifische, flexible und differenzielle Therapie möglich.

3. Durch spezifisches *Targeting* von Tumorantigenen kann die *on target, off tumor*-Toxizität auf gesunde Zellen reduziert und dadurch Nebenwirkungen vermieden werden. Ideal wäre ein Zielantigen auf Tumorzellen, das nicht auf gesunden Zellen exprimiert wird.

4. Im Gegensatz zur Therapie mit CAR-T-Zellen lässt sich die Aktivität von AdCAR-T-Zellen durch die LLE-mAb-Konzentration dosieren und damit kontrollieren.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die genannten Vorteile der Therapie mit AdCAR-T-Zellen gegenüber der Therapie mit konventionellen CAR-T-Zellen und deren Wirkung bei fluiden und soliden Malignomen *in vitro* zu zeigen. Die Funktion der AdCAR-T-Zellen und das kombinatorische *Targeting* ausgewählter Zielantigene soll exemplarisch mithilfe der Zelllinien Nalm-6 (BCP-ALL), JeKo-1 (Mantelzelllymphom), LS (Neuroblastom) und HS-578T (Mammakarzinom) in verschiedenen Zytotoxizitätsassays untersucht werden.

Das Aktivierungsmodell der AdCAR-T-Zellen wird auch als *Surface Activation Matrix* (SAM) bezeichnet. Dies besagt, dass die Aktivierung der AdCAR-T-Zellen sowohl durch eine ausreichende Konzentration eines einzelnen LLE-mAb als auch durch die Kombination verschiedener LLE-mAb in jeweils niedrigerer Konzentration (in der Summe gleiche Aktivierung) erreicht werden kann.

Mittels kombinatorischen Targetings von tumorspezifischen Antigenen mit jeweils subtherapeutischen LLE-mAb-Konzentrationen soll untersucht werden, ob eine zielgerichtete Tumorlyse bei gleichzeitig verringerter Toxizität auf gesunde Zellen möglich ist.

JeKo-1 Wildtyp- und CD19/CD20 Knockout (KO)-Varianten sollen die Situation des Antigenverlustes von Tumorzellen simulieren. Dabei soll untersucht werden, ob AdCAR-T-Zellen nicht nur spezifisch, sondern auch zeitlich flexibel Zielantigen-positive Zelllinien lysieren können.

Durch sequenzielles und differenzielles kombinatorisches *Targeting* verschiedener Antigene könnte die AdCAR-T-Zellen-induzierte Zytotoxizität auf gesunde Zellen (*on target*, *off tumor*-Effekt) reduziert oder zumindest zeitlich begrenzt werden.

Zusätzlich kann die AdCAR-T-Zell-Therapie im Rahmen einer SPIIT jederzeit flexibel und individuell neu angepasst werden. Auf diese Weise könnten Therapieversagen durch Antigenverlust des Tumors vermieden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank HERACell	Heraeus (Hanau, D)
Sterilwerkbank HERAsafe	
Mikroskope:	
Durchlichtmikroskop CX40LF200	Olympus (Hamburg, D)
Inversionsmikroskop IX50	Olympus (Hamburg, D)
Inversionsmikroskop Wilovert	Will (Wetzlar, D)
Zentrifugen:	
ROTANTA 46 RSC	Hettich (Tuttlingen, D)
ROTINA 420R	Hettich (Tuttlingen, D)
ROTIXA 50RS	Hettich (Tuttlingen, D)
Durchflusszytometer:	
BD LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
BD FACSAria II Cell Sorter	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Angeschlossene Hardware, PC	Hewlett-Packard (Palo Alto, USA)
Mr. Frosty Gefrierbehälter (jeweils 2 mL)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
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	Forma Scientific (Marietta, USA)
926 Ultra-Low Freezer Cryo	
Biostore Kryokonservierungstank -130 °C	Cryo Anlagenbau (Wilnsdorf, D)
ABL800 Flex	Radiometer (Krefeld, D)
Blutanalysegerät ABX Micros CRP 200	Horiba (Kyoto, JPN)
ADVIA 120 Hämatologie-System	Siemens (Erlangen, D)
Viktor 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Angeschlossene Hardware, PC Windows 95	Compaq (Palo Alto, USA)
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pipetten (verstellbar):	

Research: 2,5 µL, 20 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetman: 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson (Middleton, USA)
Elektrische Pipettierhilfe, PIPETBOY acu	Integra Biosciences (Hudson, USA)
Mehrkanalpipette (12) 20-200 µL	HTL (Warschau, POL)
Reagenzglasschüttler:	
REAX top	Heidolph (Schwabach, D)
Minishaker MS1	IKA (Staufen, D)
Wasserbad 10L	Memmert (Schwabach, D)
Wasserbad 1804	GFL (Burgwedel, D)
Zähluhr	Baumer (Frauenfeld, CH)
Neubauer-Zählkammer	Hecht Assistent (Sondheim/Rhön, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Material	Hersteller	Bestellnummer
Falcon, PP, steril 15 mL	Greiner Bio-One	188 271
Falcon, PP, steril 50 mL	(Frickenhausen, D)	F.2070
Hämozytometer, Deckglas 20x26 mm	Hecht Assistent	631-0673
Hämozytometer, Neubauer improved	(Sondheim/Rhön, D)	40442002
Pipettenspitzen 101-1000 µL	Sarstedt (Nümbrecht, D)	S.70.762
Pipettenspitzen 1-200 µL		S.70.760.002
Pipettenspitzen 1-10 µL	Biozym Biotech Trading GmbH (Wien, AT)	720011
Polystyrene Röhren (FC Röhrchen), Rundboden, PS, 5 mL	Corning (Corning, USA)	F.352008
Stripette, Plastik, steril, 2 mL		4021
Stripette, Plastik, steril, 5 mL		C.4051
Stripette, Plastik, steril, 10 mL		C.4101
Stripette, Plastik, steril, 25 mL		4251
Stripette, Plastik, steril, 50 mL		4501
Reaktionsgefäße, PP, 1,5 mL	Eppendorf (Hamburg, D)	0030121872

Kryoröhrchen, PP, steril, 2 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)	G.122263
Zellkulturflasche, steril, T175		660 175
Zellkulturflasche, steril, T25		690 175
Zellkulturflasche, steril, T75		658 175
Cellstar Mikropplatten, Flachboden, weiß, steril, 96 Wells	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)	655083
Zellkulturplatte, Flachboden, steril 48 Wells	Corning (Corning, USA)	3548
Zellkulturplatte, Flachboden, steril 24 Wells		3524
50 mL Spritze, Luer-Lok	BD GmbH (Franklin Lakes, USA)	300869
Zellsieb, 40µm		542070
LS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-042-401
Parafilm Verschlussfolie	Bemis (Oshkosh, USA)	PM992
Safety-Multifly Butterfly 21G	Sarstedt (Nürnbrecht, D)	85.1638.235

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller	Bestellnummer
Bad Stabil (Wasserbadstabilisator)	NeoLab Migge GmbH (Heidelberg, D)	1-6095
T Cell TransAct, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-111-160
CliniMACS PBS/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Puffer		700-29
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie Medical (Steinbach, D)	V10050
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	D8537
D-Luciferin 10 mg		L9504-10MG
Trypanblau (0,4 %)		T8154
Trypsin-EDTA 0,25 %		T4049
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco (Carlsbad, USA)	LS25300062

FACS Shutdown Solution	BD GmbH (Franklin Lakes, USA)	334224
FACSClean		340345
FACSFlow		342003
FACSRinse		340346
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm (Ulm, D)	Ch.-B. T23531A
Human-Albumin, 20 %	CSL Behring GmbH	J9344411A
Isopropanol	Interlock Medizintechnik GmbH (Lensahn, D)	02009
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin, D)	L6115

2.1.4 Antikörper und Zytokine

Tabelle 2.4: Verwendete Beads und Zytokine

Material	Hersteller	Bestellnummer
CD8 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-045-201
CD4 MicroBeads, human		130-045-101
MACSelect™ LNGFR MicroBeads		130-091-330
REAl ease™ CD19 MicroBead Kit, human		130-117-034
MACS CompBead Kit, Anti-REA		130-104-693
Interleukin 15 (IL15), human, premium grade		130-095-765
Interleukin 7 (IL7), human, premium grade		130-095-364
BD™ CompBeads Ig, κ, Anti-Mouse	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	51-90-9001229
BD™ CompBeads negative control		51-90-9001291

2.1.4.1 Fluorophor-markierte Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Fluorophor-markierte Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Biotin-Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Bio3-18E7	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-090-857
Anti-Biotin-Allophycocyanin (APC)	REA746		130-110-952

Anti-CD3-VioBlue, human	BW264/56		170-078-059
Anti-CD3-APC, human	REA 613		130-113-135
Anti-CD19-APC, human	REA675		130-113-642
Anti-CD19-FITC, human	REA675		130-113-645
Anti-CD20-Phycoerythrin (PE), human	REA675		130-110-248
Anti-CD8-APC Vio770, human	BW135/80		130-096-561
Anti-CD271 (LNGFR)-FITC, human	ME20.4-1.H4		130-091-917
Anti-CD4-brilliant ultraviolett (BUV) 395, human	SK3	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	563550

2.1.4.2 Biotinylierte Antikörper

Tabelle 2.6: Verwendete biotinylierte Antikörper

Antikörper	Konzentration	Klon	Hersteller	Bestellnummer
Anti-CD19-Biotin, human	11 ng/μL	REA675	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-113-642
Anti-CD20-Biotin, human	100 ng/μL	REA780		130-111-336
Anti-CD22-Biotin, human	22 ng/μL	REA340		130-105-054
Anti-CD10-Biotin, human	250 ng/μL	REA877		130-114-500
Anti-CD138-Biotin, human	11 ng/μL	44F9		130-099-161
Anti-CD171 (L1CAM)-Biotin, human	8,25 ng/μL	REA163		130-100-702
Anti-CD276 (B7H3)-Biotin, human	33 ng/μL	FM276		130-095-514
Anti-CD79b-Biotin, human	82,5 ng/μL	REA120		130-099-137
Anti-CD47-Biotin, human	22 ng/μL	REA220		130-101-342
Anti-CD37-Biotin, human	5,5 ng/μL	REA366		130-105-241
Anti-CD81-Biotin, human	55 ng/μL	REA513		130-107-918
Anti-CD117-Biotin, human	50 ng/μL	REA787		130-111-591
Anti-ROR1-Biotin, human	2,2 ng/μL	2A2		130-098-312

REA Control-Biotin	30 ng/μL	REA293		130-104-622
Anti-GD2-Fab ch14.18-Biotin	70 ng/μL	14G2a	Davids Biotech (Regensburg, D)	B188585
Anti-EGFR-Biotin	200ng/μL	C225		Restbestand

2.1.5 Software

Tabelle 2.7: Verwendete Software

Programm	Hersteller
BD FACSDIVA v6.1.3	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Excel 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Word 2016	Microsoft (Redmond, USA)
PowerPoint 2016	Microsoft (Redmond, USA)
FlowJo 10.4	BD GmbH (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism 8	GraphPad (San Diego, USA)
Wallac 1420 Workstation	Wallac (Turku, Finnland)

2.1.6 Zellkulturmedien

Tabelle 2.8: Verwendete Bestandteile für Zellkulturmedien

Material	Hersteller	Bestellnummer
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	F1215
TexMACS GMP Medium	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	170-076-306
VLE DMEM	Biochrom (Berlin, D)	FG 1445
Hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (englisch <i>fetal calf serum</i> , h. i. FCS)	Gibco (Carlsbad, USA)	S0115
L-Glutamin 200 mM	Biochrom (Berlin, D)	K0282
Penicillin 10 000 U/mL + Streptomycin 0,01 g/mL (P/S)	Biochrom (Berlin, D)	P06-07050

Tabelle 2.9: Zelllinien-abhängige Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zelllinie	Zusammensetzung des Mediums
Nalm-6 (Luc-mCherry)	500 mL RPMI-Medium
JeKo-1 (Luc-GFP)	+ 50 mL h. i. FCS (10 %)
LS (Luc-mCherry)	+ 5 mL Penicillin/Streptomycin (1 %) + 5 mL L-Glutamin (1 %)
HS-578T (Luc-mCherry)	500 mL Dulbeccos VLE DMEM-Medium + 50 mL h. i. FCS (10 %) + 5 mL Penicillin/Streptomycin (1 %)
T-Zellen und AdCAR-T-Zellen	200 mL TexMACS Medium + 2 mL Penicillin/Streptomycin (1 %) + 200 µL IL-7 (10 µg/mL) + 100 µL IL-15 (10 µg/mL)

2.1.7 Zellmaterial

Die Zelllinie **Nalm-6** wurde 1976 aus der peripheren Blutprobe eines 19 Jahre alten Patienten mit rezidivierter BCP-ALL isoliert [149]. Die runden, einzelnen Zellen wachsen in Suspension.

Die Zelllinie **JeKo-1 wt** wurde aus der peripheren Blutprobe einer 78 Jahre alten Frau mit einem Mantelzelllymphom isoliert [150]. Die runden, einzelnen Zellen wachsen in Suspension. Eine große klinische Herausforderung in der CAR-T-Zell-Therapie stellt der Antigenverlust der Tumorzellen (zum Beispiel durch Mutation) dar, der häufig zum Therapieversagen führt [144, 145, 151]. Um dieses Problem zu untersuchen, wurden **JeKo-1 CD19**, **CD20** und **CD19/20 KO**-Varianten verwendet, die von Miltenyi Biotec mittels CRISPR/Cas9-Knockout generiert wurden. Alle vier Varianten der Zelllinie Jeko-1 wurden von Miltenyi Biotec zur Verfügung gestellt und zeigen eine ähnliche Wachstumskinetik, wodurch eine Vergleichbarkeit garantiert war.

Die Neuroblastomzelllinie **LS** wurde aus der Tumorprobe einer 16 Monate alten Patientin mit Neuroblastom Grad III isoliert [152]. Es handelt sich um polymorphe Zellen, die adhärent wachsen. Aus den in Stickstofftanks kryokonservierten Zellbeständen der Universitätsklinik für Kinderheilkunde Tübingen wurden für diese Arbeit LS

Zellpopulationen mit stabiler und ohne Luciferase (Luc)-Expression zur Verfügung gestellt.

Die Brustkrebszelllinie **HS-578T** wurde 1977 aus der Tumorprobe einer 74 Jahre alten Patientin kaukasischer Herkunft isoliert [153]. Die irregulär geformten Epithelzellen wachsen adhärent. Die Zellen wurden vom Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien Nalm-6, LS und HS-578T wurden bereits von vorherigen Doktorandinnen und Doktoranden mittels eines Luc-mCherry Plasmids und die Zelllinien JeKo-1 mittels eines Luc-GFP Plasmids mit einem Luciferase-Fluoreszenz-Gen transduziert.

Die **AdCAR-T-Zellen** sowie die B-Zellen wurden aus der Vollblutspende gesunder Donoren (D1, D2, D3 oder D6) gewonnen.

Die **lentiviralen Plasmide** (Virus No 4 Lipo) zur AdCAR-T-Zell-Herstellung wurden in HEK-293T Zellen vervielfältigt. HEK-293T Zellen sind humane, embryonale Nierenkarzinomzellen, die von Clontech (Mountain View, USA) erworben wurden. Nach der Virusernte wurden die Virusüberstände bei -80 °C aufbewahrt. Zur intrazellulären Replikation sind die lentiviralen Vektoren nicht fähig.

Ein Ethikvotum liegt vor: 761/2015B02.

2.2 Zellkultur und Zelllinien

Die Kultivierung aller Zellkulturen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C Lufttemperatur, 5 % CO₂-Gehalt und 90 % Luftfeuchtigkeit. Je nach Zellanzahl und ihrer gewünschten Dichte wurden die Zellen in unterschiedlichen Volumina in Zellkulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² gepflegt. Die Zelldichte und Zellvitalität wurden dabei zunächst mit einem Inversionsmikroskop beurteilt.

Die durchgeführte Zellpflege orientierte sich an der Empfehlung der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

2.2.1 Zellpflege von Suspensionszellen

Die Zelllinien Nalm-6, JeKo-1 sowie die AdCAR-T-Zellen sind Suspensionszellen, die in Kultur einzeln oder in mehrzelligen Aggregaten in Suspension vorliegen.

Die Zellpflege wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Die genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgte aus einer Zellprobe mit Hilfe der Geräte ADVIA 120 und ABX Micros CRP 200 oder mit der Neubauer Zählkammer. Bei Letzterer wurde nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblau außerdem die Zellmorphologie und damit die Zellvitalität beurteilt.

Tumorzelllinien

Als Kulturmedium wurde bei den Tumorzelllinien RPMI 1640-Medium mit 1 % P/S, 10 % h. i. FCS und 1 % L-Glutamin verwendet (siehe Tabelle 2.9).

Die Tumorzellen wurden auf eine Zelldichte von 0,5 Millionen/mL eingestellt. Hierzu wurde das Volumen mit der gewünschten Zellzahl abgenommen und dann mit der entsprechenden Menge an Kulturmedium aufgefüllt, um die gewünschte Zelldichte zu erhalten.

AdCAR-T Zellen

Die AdCAR-T-Zellen wurden in TexMACS-Medium mit 1 % P/S und 0,1 % Interleukin-7 und 0,05 % Interleukin-15 kultiviert (siehe Tabelle 2.9).

Wenn sich die Zellen nach zwei Tagen mehr als verdoppelt hatten, wurden diese auf eine Dichte von 0,8 Millionen/mL und ansonsten auf 1 Million/mL eingestellt.

2.2.2 Zellpflege adhärenter Zellen

Die Zelllinien LS und HS-578T sind adhärenente Zellen, die in Kultur als einzelne Schicht am Boden wachsen. Als Kulturmedium wurde bei der Tumorzelllinie LS RPMI 1640-Medium mit 1 % P/S, 10 % h. i. FCS und 1 % L-Glutamin verwendet und bei den Zelllinien HS-578T VLE-Medium mit 1 % P/S und 10 % h. i. FCS (siehe Tabelle 2.9).

Die Zellpflege erfolgte alle zwei bis drei Tage.

Zunächst wurde das gesamte Medium vorsichtig entnommen. Um Serumreste zu entfernen, wurde der Zellrasen mit 100 µL gepufferter Kochsalzlösung (englisch

phosphat buffered saline, PBS) pro cm² gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit 30 µL Trypsin-EDTA pro cm² (0,05%iges Trypsin bei LS und 0,25%iges Trypsin bei HS-578T) benetzt und im Brutschrank bei 37 °C für maximal 4 Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung von Trypsin wurden etwa 90 µL Zellkulturmedium pro cm² hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 20 °C 5 Minuten lang mit 300g und 9/R9 abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde aus einer Zellprobe mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von 20.000/cm² mit 90 µL Zellkulturmedium pro cm² eingestellt.

2.2.3 Einfrieren

Als Vorbereitung für das Einfrieren wurde zunächst eine Mr. Frosty Einfrierhilfe in einem -20 °C-Gefrierschrank kaltgestellt und das Einfriermedium gemischt, welches sich aus 90 % h. i. FCS und 10 % DMSO zusammensetzte. Für jedes *Kryotube* wurden 1,5 mL Einfriermedium verwendet. Die einzufrierende Zellzahl pro *Kryotube* betrug bei den Tumorzelllinien zwischen 10 und 50 Millionen und bei den AdCAR-T-Zellen zwischen 25 und 100 Millionen. Die Zellen wurden der jeweiligen Zellkultur entnommen und bei 20 °C 10 Minuten lang mit 250g und 9/R9 zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen in Suspension wurden möglichst schnell in die *Kryotubes* gefüllt und dann umgehend in einem -80 °C-Gefrierschrank eingefroren.

2.2.4 Auftauen

Das *Kryotube* mit den aufzutauenden Zellen wurde so lange in ein Wasserbad mit 37 °C getaucht, bis sich die Eiskristalle nahezu komplett aufgelöst hatten. Daraufhin wurden die Zellen in Suspension in ein 50 mL-Falcon mit 37 °C warmem entsprechenden Kulturmedium pipettiert und bei 20 °C 10 Minuten lang bei 300g und 9/R9 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet im Kulturmedium resuspendiert. Die Suspensionstumorzelllinien wurden auf eine Zelldichte von 1 Million/mL und die AdCAR-T-Zellen auf 2 Millionen/mL eingestellt. Die adhärenen Tumorzelllinien wurden mit einer Dichte von 0,1 Millionen/mL ausgesät. Die Zelldichte

und Zellmorphologie wurden in den folgenden Tagen mit einem Inversionsmikroskops beurteilt und die Zellen dementsprechend gepflegt. Etwa die Hälfte der eingefrorenen Zellen ging in Apoptose, die restlichen Zellen benötigten bis zu zwei Wochen, bis sie die Proliferationsrate ihrer Zelllinie erreicht hatten.

2.2.5 Zytokinfreie Kultivierung von AdCAR-T-Zellen

72 Stunden vor Beginn jedes Experiments wurde die gewünschte Menge an AdCAR-T-Zellen in zytokinfreies Medium überführt, um ihre unspezifische Aktivität zu reduzieren und möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Hierzu wurde das Volumen mit der gewünschten Zellzahl entnommen und bei 20 °C 12 Minuten lang bei 200g und 9/R7 zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden auf eine Dichte von 1 Million/mL eingestellt.

Die AdCAR-T-Zellen wurden in TexMACS-Medium mit 1 % P/S kultiviert.

2.3 **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (englisch *flow cytometry*, FC) ist eine Methode zur quantitativen Analyse der Antigene, Granularität und Größe von Zellen. Mit Hilfe des FC kann eine immunologische Phänotypisierung von Zellen erfolgen, indem ihre Antigene durch fluoreszierende Antikörper gebunden und dadurch bestimmt werden.

Bei der Messung werden die Zellen einer Zellsuspension in eine Kapillare gesaugt und mittels hydrodynamischer Fokussierung zentriert. Dadurch gelangen die Zellen einzeln in die Messzelle, in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Detektiert werden zum einen die Lichtstreuung und zum anderen die Fluoreszenzemissionen der an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Ein Durchflusszytometer besitzt zwei Streulichtdetektoren: Das Vorwärtsstreulicht (englisch *forward scatter*, FSC) wird in der gleichen Ebene wie der Laserstrahl, das Seitwärtsstreulicht (englisch *side scatter*, SSC) im 90° Winkel zu den Zellen von Detektoren registriert (siehe Abbildung 2.1). Die Streuung des Lichts korreliert mit den Eigenschaften der Zellen: Das Vorwärtsstreulicht entsteht, wenn das Licht an der Zelloberfläche abgelenkt wird und hängt von der Zellgröße ab. Das Seitwärtsstreulicht entsteht durch Lichtbeugung an inneren Zellmembranen und hängt von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres

Zellkerns und der Menge der Vesikel ab. Mit Hilfe von FSC und SSC können die verschiedenen Blutzellen unterschieden werden.

Das Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulicht wird im 90° Winkel gestreut von einer Linse gesammelt und daraufhin über dichroitische Spiegel aufgeteilt (siehe Abbildung 2.1). Ein dichroitischer Spiegel lässt Licht über (englisch *long pass*) oder unter (englisch *short pass*) einer bestimmten Wellenlänge durch. Das restliche Licht wird reflektiert. Dadurch wird das Streulicht entsprechend seiner Wellenlängen auf unterschiedliche Detektoren verteilt. Auf diese Weise können verschiedene Fluorochrome und Antigene nachgewiesen werden. Die Emissionsintensität ist proportional zur Anzahl der an Antigene gebundenen, Fluoreszenz-markierter Antikörper und ermöglicht bei einem Vergleich zu einer Referenzprobe eine semiquantitative Analyse der Antigene einer Zelle. Das kurzwellige Licht landet beim SSC-Detektor. Die Detektoren wandeln die Signale in elektrische Spannungen um.

Jede Zelle führt zu einer gewissen Menge an Streulicht in jedem Wellenbereich, auch wenn sie nicht mit dem entsprechenden Fluorochrom markiert ist. Um festzustellen, ob die Fluoreszenzemission von der Antigenexpression abhängt, ist eine Kontrolle mit ungefärbten Zellen zur Kalibrierung unbedingt nötig [154, 155].

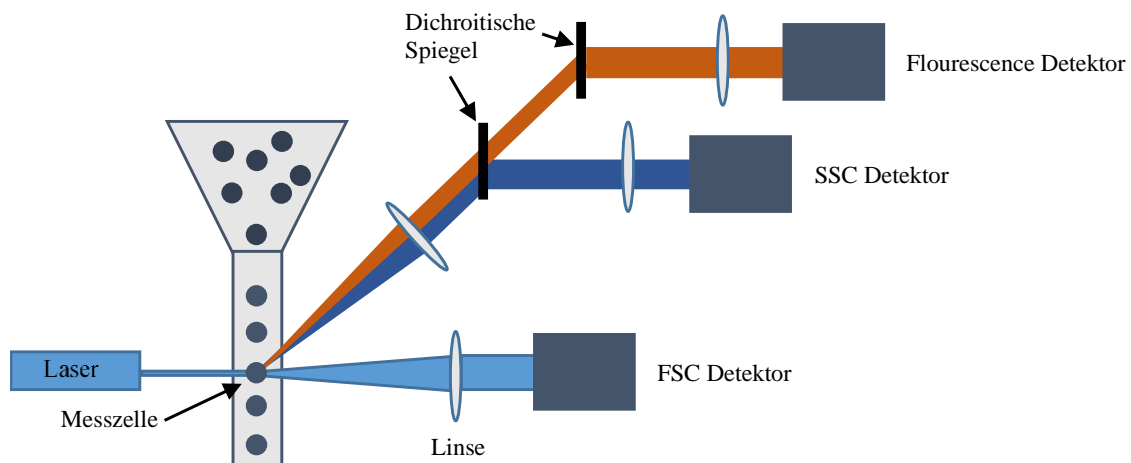


Abbildung 2.1: Aufbau eines Durchflusszytometers

Über eine Messkapillare gelangen die Zellen einzeln in die Messzelle und werden dort hydrodynamisch fokussiert. Dadurch wird erreicht, dass der Laserstrahl immer nur auf eine Zelle trifft. Das resultierende Streu- und Fluoreszenzlicht wird über ein optisches System zu verschiedenen Detektoren geleitet und in elektrische Spannung umgewandelt.

2.3.1 Durchführung

Bei der FC-Färbung wurden immer eine ungefärbte (englisch *unstained*) und eine gefärbte (englisch *stained*) Probe hergestellt. Für die gefärbte Probe wurden 0,2 bis 1×10^6 Zellen in ein FC-Tube pipettiert und mit 2 mL MACS-Puffer bei 4 °C 5 Minuten lang bei 400g und 9/R7 zentrifugiert. Der Überstand wurde durch schnelles Abschütten und Abtupfen auf saugfähigem Material möglichst vollständig entfernt.

Bei der FC-Sekundärfärbung wurden die zu untersuchenden Antigene der Zellen mit biotinylierten Antikörpern gefärbt (zum Beispiel Anti-CD19-Biotin). Dafür wurden 5 µL der Antikörper-Suspension auf das Zellpellet gegeben und die Zellsuspension mit der Pipette durchmischt. Die Probe wurde im Kühlschrank bei etwa 7 °C 15 Minuten lang inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Waschung mit 2 mL MACS-Puffer. Im zweiten Färbeschritt wurden 5 µL des Fluoreszenz-markierten Antikörpers (zum Beispiel Anti-Biotin-FITC) auf das Zellpellet gegeben. Es folgte eine erneute 15-minütige Inkubation bei 7 °C und eine Waschung mit 2 mL MACS-Puffer.

Bei der FC-Primärfärbung entfiel die erste Färbung. Hier war eine gleichzeitige Färbung verschiedener Antigene mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (zum Beispiel Anti-CD19-APC und Anti-CD3-VioBlue) möglich.

Die gefärbten Zellsuspensionen wurden bis zur Messung im Kühlschrank im Dunkeln maximal zwei Stunden lang ohne Fixierung aufbewahrt. Die Fixierung erfolgte mit 1%igem Formaldehyd (1 % Formaldehyd, 99 % MACS-Puffer) im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem BDTM LSR II Flow Cytometer durchgeführt.

2.3.2 Auswertung

Die FC-Daten wurden aus der Software FC-Diva als fcs-Dateien exportiert und mit FlowJo 10.4 sowie Excel ausgewertet (siehe Kapitel 2.6.2.2 mit Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9). Anhand der Referenzkontrollen wurden die Rohdaten (englisch *counts*) normalisiert und die prozentuale Lyse bei den verschiedenen Konditionen berechnet.

Die FlowJo-Gating Strategie zur Ermittlung der Antigenexpression ist in Abbildung 2.2 am Beispiel von Nalm-6 Zellen und CD19 dargestellt. Zunächst wurde die

Hauptpopulation der lebenden, einzelnen Zellen ausgewählt. Daraufhin wurde die Emission der Zellen bei der Wellenlänge des Fluorochrom-markierten Antigens detektiert und mit der unspezifischen Emission einer Isotypkontrolle verglichen.

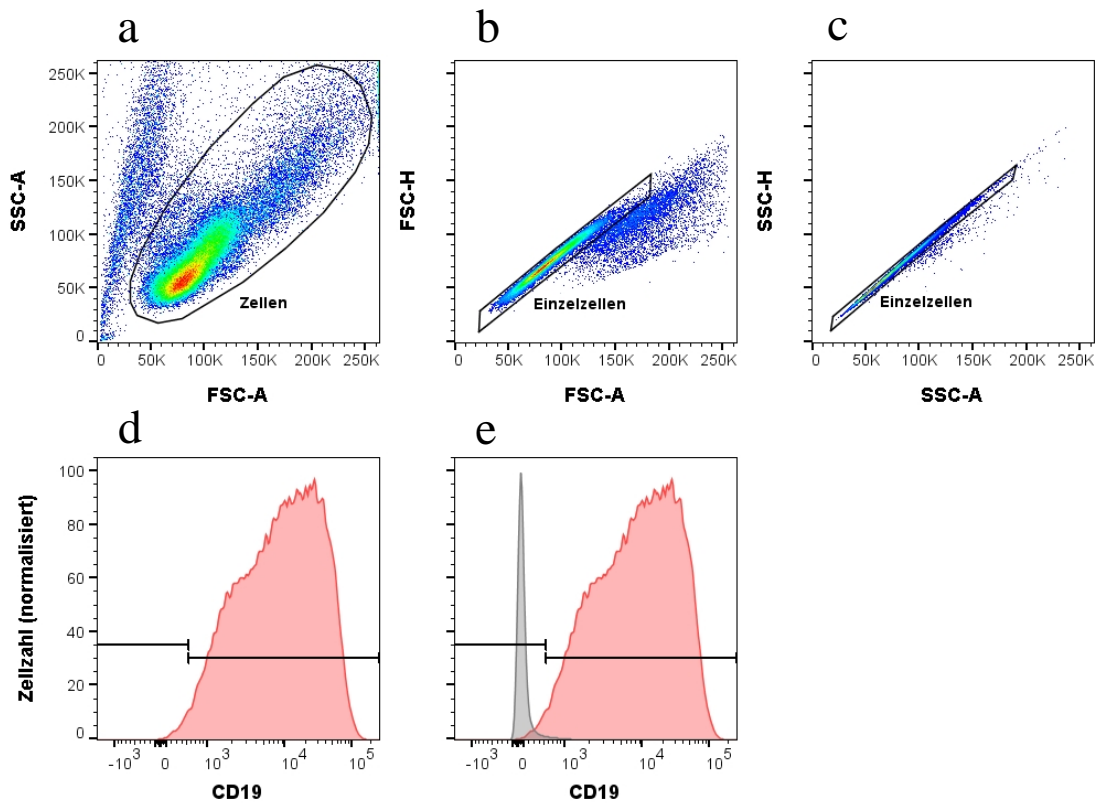


Abbildung 2.2: FlowJo-Gating Strategie zur Ermittlung der Antigenexpression
(am Beispiel von Nalm-6 und CD19)

Durchflusszytometrische Analyse der CD19-Expression von Nalm-6 Zellen. Zunächst wurde die Hauptpopulation der lebenden Nalm-6-Zellen (a) sowie daraus im nächsten Schritt die Einzelzellen (b, c) ausgewählt. In der Hauptpopulation wurden mindestens 10 000 lebende Zellen (englisch *events*) gemessen. Detektion der Emission der Zellen bei der Wellenlänge des Fluorochrom (APC)-markierten Antigens CD19 (rot) (d) im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (grau) (e). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen; FC-Analyse mit BD™ LSR II Flow Cytometer; FC-Auswertung mit FlowJo 10.4 und Excel; Ergebnis: CD19-Expression 99 %.

2.3.3 Transduktionskontrolle des Luciferase-Gens

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden mit einem Luciferase-Fluoreszenz-Gen mittels eines lentiviralen Plasmids transduziert (siehe Kapitel 2.1.7). Die Fluorochrome mCherry oder GFP fungieren als Reportergene und werden äquimolar zu Luciferase koexprimiert, sodass fluoreszierende Zellen im PE Dynamics590 (Luc-mCherry) und FITC (Luc-GFP)

Kanal als Luciferase-positiv gewertet wurden. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen der gleichen Zelllinie.

Um eine reine Luciferase-positive Zellpopulation zu erhalten, wurden die Zellen vier Passagen nach der Transduktion mittels FC positiv selektioniert. Nach weiteren vier Passagen Kultivierung wurden die Zellen erneut auf eine erfolgreiche Selektion und stabile Expression geprüft.

2.3.4 Kontrolle der Antigenexpression der Tumorzelllinien

Entsprechend der Literaturrecherche wurden alle Tumorzelllinien auf mögliche Zielantigene für die Therapie mit AdCAR-T-Zellen untersucht. Für die Sekundärfärbung wurden die biotinylierten mAb verwendet, die auch später bei den Zytotoxizitätsassays als Adaptermoleküle eingesetzt wurden (siehe Kapitel 2.3.1). Dadurch war eine relative Bestimmung der Antigenexpression sowie der Bindungsstärke zwischen Antigen-Epitop, Adaptermolekül und AdCAR-T-Zelle möglich.

Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen, Zellen mit Fluoreszenz-markiertem Primärantikörper gegen ein nicht-exprimiertes Antigen und mit Anti-Biotin Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper gefärbte Zellen.

Die mittlere Fluoreszenz-Intensität (englisch *median fluorescence intensity*, MFI) der transduzierten Zellen wurde mit der MFI der Kontrollgruppe verglichen: Die MFI-Ratio (MFIR) gibt an, um welchen Faktor die MFI der transduzierten Zellen höher ist als die Autofluoreszenz der Kontrollpopulation. Sie ist daher ein Maß für die Dichte des untersuchten Antigens.

2.3.5 Zellsortierung einer Zelllinie

Die Zellen in Suspension wurden bei 20 °C 10 Minuten lang bei 300g und 9/R9 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert und auf eine Zelldichte von 2 Millionen/mL eingestellt. Größere Zellkonglomerate wurden mittels Zellsieb entfernt. Die Zellen wurden bis zum Sortieren auf Eis gelagert.

Zur Aufreinigung der Zellen wurden zusätzlich unmarkierte Luc-mCherry-negative Zellen als Kontrolle (für die FC-Einstellungen), steriler MACS-Puffer und mehrere

15 mL-Falcons mit jeweils 1 mL Kulturmedium zum Auffangen von jeweils etwa 1,5 Millionen aufgereinigten Zellen benötigt.

Die aufgereinigten Zellen wurden am Ende zusammengeführt und bei 20 °C 10 Minuten lang bei 300g und 9/R9 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf eine Zelldichte von 1 Million/mL eingestellt.

2.4 Magnetic Activated Cell Sorting

Magnetic activated cell sorting (MACS) ist eine Methode zur Separation von Zellen aus einer Zellsuspensionen mit Hilfe der magnetischen Markierung von Antigenen. Die Markierung (englisch *labeling*) der gesuchten Zellpopulation erfolgt mit etwa 50 nm großen Magnet-Antikörper-Partikeln, sogenannten *MicroBeads*, die mit dem Zellgemisch inkubiert werden (siehe Abbildung 2.3). Anschließend durchläuft die Zellsuspension eine Magnetsäule, die von einem Magnetfeld umgeben ist, sodass die markierten Zellen am Magnet hängen bleiben. Die markierte Zellpopulation wird durch Spülen der Magnetsäule isoliert. Es handelt sich hierbei um eine positive Selektion. Bei der Depletion werden die nicht-markierten Zellen, welche die magnetische Säule durchlaufen haben, weiterverwendet und die Zellen in der Säule verworfen.

Die *MicroBeads* besitzen eine Polysaccharid-Hülle, die sich nach einigen Tagen zersetzt, sodass sich die Partikel von den Zellen lösen [156].

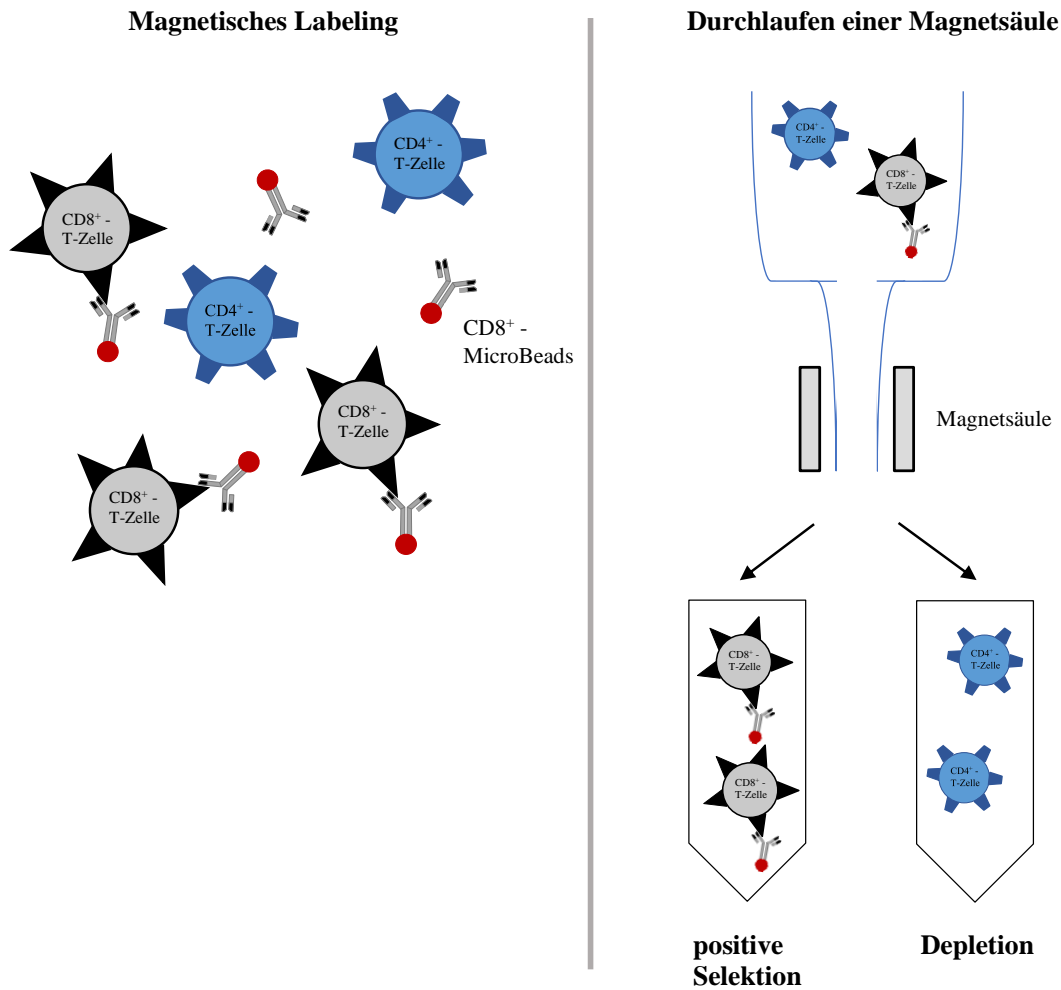


Abbildung 2.3: Zellseparation mittels MACS

Die magnetische Markierung (englisch *labeling*) von CD8⁺-T-Zellen erfolgte durch die Inkubation einer T-Zell-Suspension mit CD8⁺-*MicroBeads* (links). Im nächsten Schritt (rechts) durchlief die Zellsuspension eine Magnetsäule. Die markierten CD8⁺-T-Zellen blieben an der Magnetsäule hängen, während die CD4⁺-T-Zellen die Säule ungehindert durchlaufen konnten (Depletion). Die markierten CD8⁺-T-Zellen wurden durch Spülen der Magnetsäule isoliert (positive Selektion).

2.4.1 Durchführung

Das Zellpellet wurde in 80 µL MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Zusätzlich wurden der Zellsuspension 20 µL *MicroBeads* pro 1×10^7 Zellen zugefügt und die Zellsuspension 15 Minuten lang im Kühlschrank bei 7 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 bis 2 mL MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen zugefügt und die Zellsuspension bei 4 °C 10 Minuten lang mit 250g und 9/R7 zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet mit maximal 1×10^8 Zellen in 1 mL MACS-Puffer resuspendiert.

Im QuadroMACS-Separator wurde eine Magnetsäule pro 1×10^8 Zellen platziert und zunächst mit 3 mL gekühltem MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Säule pipettiert und dreimal mit jeweils 3 mL gekühltem MACS-Puffer gespült. Die durchgelaufene Zellsuspension wurde in einem unter die Magnetsäule gestellten 50 mL-Falcon gesammelt. Die Flüssigkeit war jeweils fast durch die Säule gelaufen, bevor neue hinzugefügt wurde. Gleichzeitig durfte die Magnetsäule nicht trocken laufen. Zur positiven Selektion wurden 5 mL MACS-Puffer in die Magnetsäule pipettiert, die Säule aus dem QuadroMACS-Separator entfernt und die gelabelten Zellen mit dem Stempel aus der Magnetsäule in ein 50 mL-Falcon gespült. Die Zellsuspension wurde mit gekühltem RPMI-Medium ohne Zusätze auf 50 mL aufgefüllt und dreimal jeweils 10 Minuten lang bei 4 °C mit 250g und 9/R7 gewaschen.

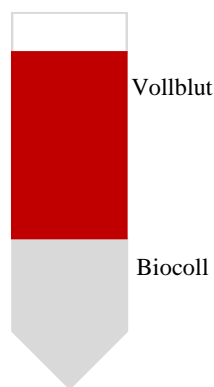
2.5 Herstellung von AdCAR-T-Zellen

Die AdCAR-T-Zellen wurden entsprechend des folgenden zeitlichen Ablaufs hergestellt:

Tag 0	Mononukleäre Blutzellen (PBMC)-Isolierung CD8 ⁺ -/CD4 ⁺ -T-Zellen-Isolierung Stimulation der T-Zellen mit TransAct
Tag 1	Virale Transduktion
Tag 3	TransAct-Verdünnung
Tag 4	Überführen in Zellkulturflaschen
Tag 7	LNGFR-FC

2.5.1 PBMC-Isolierung

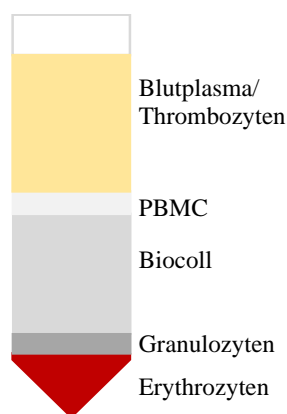
Die Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (englisch *peripher blood mononuclear cells*, PBMC) erfolgte aus einer heparinisierten Vollblutspende von freiwilligen gesunden Donoren. In 1 mL Blut befinden sich etwa 1 Million mononukleäre Zellen. Davon sind etwa 50 % T-Zellen mit einem Verhältnis von 1:2 CD8⁺- zu CD4⁺-T-Zellen [157].



Zunächst wurde das heparinisierte Vollblut in dem Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend folgte in 50 mL-Falcons eine sorgsame Schichtung von 30 mL der Blut-PBS-Mischung auf 20 mL Biocoll, einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, das bei Raumtemperatur eine Dichte von 1,077 g/mL besitzt. Durch die unterschiedliche Dichte bildeten sich zwei Phasen (siehe Abbildung 2.4).

Abbildung 2.4: Schichtung des Vollbluts über Biocoll

Vollblut besitzt eine höhere Dichte als Biocoll. Bei einer sorgsamen Schichtung des Bluts über Biocoll ergeben sich dadurch zwei Phasen.



Daraufhin wurden die Falcons bei 20 °C 30 min lang bei 800g und 1/R1 zentrifugiert. Durch die Schichtung auf Biocoll konnte nun eine Auftrennung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte erfolgen (siehe Abbildung 2.5) [158].

Abbildung 2.5: Auftrennung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte

Erythrozyten und Granulozyten sind schwerer als Biocoll und lagern sich nach Zentrifugation unterhalb der Biocoll-Schicht ab. Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), welche sich aus Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen zusammensetzen, besitzen eine etwas niedrigere Dichte als Biocoll und sammeln sich direkt darüber als feiner Ring an. Die niedrigste Dichte hat das Blutplasma mit Thrombozyten. Diese bilden die oberste Phase der Schichtung [158].

Mit Hilfe einer 25 mL-Stripette wurden die PBMC-Ringe direkt oberhalb der Biocoll-Phase vorsichtig aspiriert, in 50 mL-Falcons zusammengeführt und anschließend zweimal mit PBS bei 20 °C 10 min lang bei 500g bzw. 400g und 9/R9 gewaschen. Nach der 2. Waschung wurde das Zellpellet nach Abschütten des Überstandes in 10 mL PBS pro 100 mL Vollblut resuspendiert und die Zellen mit dem ADVIA 120 gezählt. Nach Abnahme des zu zählenden Volumens erfolgte eine 3. Waschung mit PBS.

2.5.2 CD8⁺/CD4⁺-T-Zellen-Isolierung

Die positive Selektion der CD8⁺/CD4⁺-T-Zellen orientierte sich an dem Datenblatt von Miltenyi Biotec für CD8- und CD4-*MicroBeads* und wurde entsprechend des Protokolls in Kapitel 2.4.1 durchgeführt.

Nach der 3. Waschung der PBMC (siehe Kapitel 2.5.1) wurde der Überstand vollständig entfernt. Es erfolgte zunächst eine positive Selektion der CD8⁺-T-Zellen.

Die unter der Magnetsäule im 50 mL-Falcon aufgefangene Zellsuspension mit CD4⁺-T-Zellen wurde 10 Minuten lang bei 4 °C mit 250g und 9/R7 abzentrifugiert. Es folgte die positive Selektion der CD4⁺-T-Zellen.

Jeweils nach der 2. Waschung mit RPMI-Medium wurden die Zellen mit dem ADVIA 120 gezählt.

2.5.3 Stimulation der T-Zellen

Nach der 3. Waschung wurden die CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen jeweils in 1 mL 37 °C-warmen TexMACS-Medium mit 1 % P/S, 0,1 % Interleukin-7 und 0,05 % Interleukin-15 (siehe Kapitel 2.2.1) pro 1×10^6 Zellen aufgenommen.

Von beiden Zellsuspensionen wurde jeweils 1 mL pro *Well* einer 24-Well-Platte pipettiert, sodass sich am Ende in jedem *Well* jeweils 1 Million CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen in 2 mL befanden. Es wurden 20 µL des Zellstimulans TransAct in jedes *Well* pipettiert und gut verteilt. Es handelt sich hierbei um eine kolloidale polymere Nanomatrix, die mit humanisierten CD3- und CD28-Agonisten konjugiert ist und stimulierende Signale für eine optimale und effiziente T-Zell-Aktivierung und -Expansion liefert (siehe Herstellerangaben/Datenblatt von Miltenyi Biotec).

2.5.4 Virale Transduktion

Am 1. Tag nach der T-Zell-Expansion wurde aus jedem *Well* zunächst vorsichtig 1 mL Medium abgenommen, möglichst ohne Zellen vom unteren Teil des *Wells* zu aspirieren. Je nach Virusart und -herstellung wurden 10 bis 20 µL des aufgetauten Virusüberstandes pro *Well* pipettiert. Ein *Well* mit 2 Millionen T-Zellen wurde ausgelassen und diente später beim LNGFR-FC als Kontroll-Probe. Die 24-Well-Platte wurde anschließend 30 Minuten lang bei 32 °C mit 800g und 9/R0 zentrifugiert.

2.5.5 TransAct-Verdünnung

Am 3. Tag wurden aus jedem *Well* vorsichtig 0,5 mL Medium abgenommen und daraufhin 2 mL des 37 °C-warmen TexMACS-Medium pro *Well* hinzugefügt.

Am 4. Tag wurde erneut aus jedem *Well* 1 mL Medium abgenommen. Die Zellen wurden resuspendiert, mit 37 °C-warmen TexMACS-Medium gespült und in Zellkulturflaschen zusammengeführt, wobei zwischen transduzierten AdCAR-T-Zellen und nicht-transduzierten T-Zellen getrennt wurde. Es erfolgte eine Verdreifachung des ursprünglichen Volumens von 2,5 mL pro *Well*.

Die weitere Zellpflege erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

2.5.6 Ermittlung der Transduktionseffizienz: LNGFR-FC

Mit Hilfe der FC-Analyse des koexprimierten Antigens LNGFR wurde die AdCAR-Expression der hergestellten AdCAR-T-Zellen möglichst am 7. Tag ermittelt. Dabei wurde jeweils ein FC-Tube „ungefärbte-Kontrolle“, „gefärbte-Kontrolle“ und „gefärbte AdCAR-T-Zellen“ hergestellt. Die FC-Färbung wurde entsprechend des Protokolls in Kapitel 2.3.1 durchgeführt mit 5 µL LNGFR-FITC, 5 µL Anti-CD8-APC-VIO 770 und 3 µL Anti-CD4-BUV395. Mit Hilfe der gefärbten Kontrolle wurde die positive LNGFR-Expression von unspezifischer Fluoreszenz abgegrenzt (siehe Abbildung 2.6). Die LNGFR-positiven T-Zellen wurden über die CD4- und CD8-Expression in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aufgetrennt.

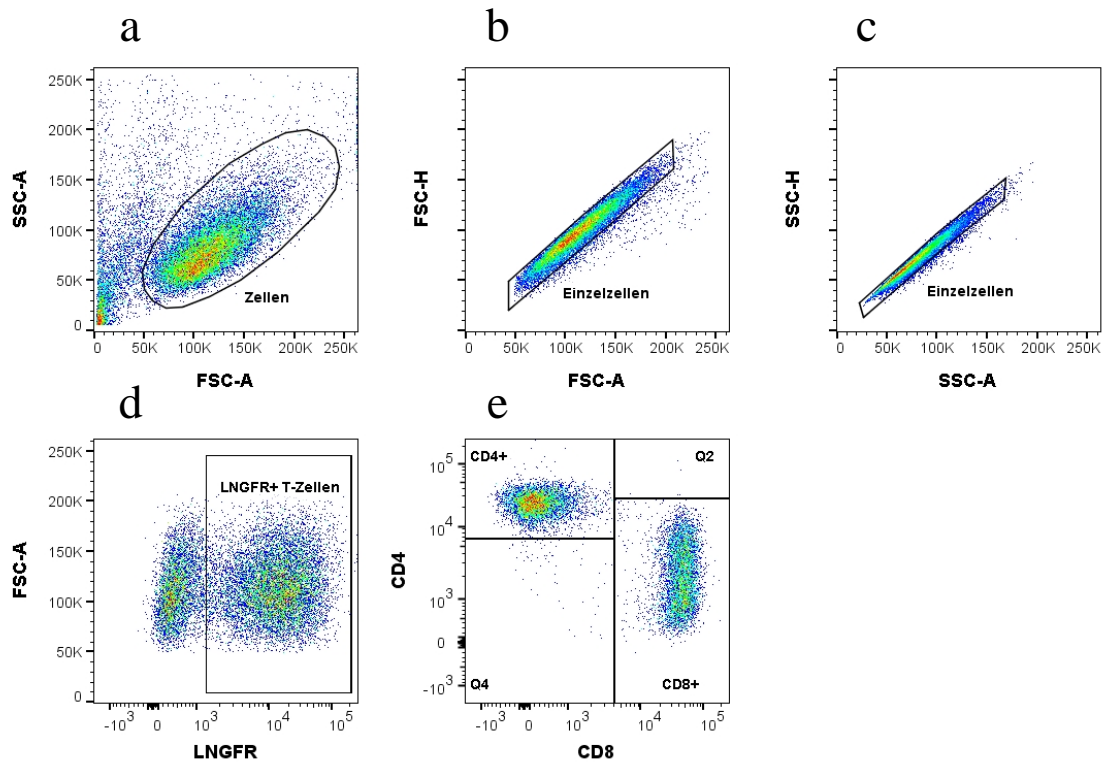


Abbildung 2.6: FlowJo-Gating Strategie zur Ermittlung der LNGFR-Transduktion

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden aufgereinigte CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen verwendet, die das AdCAR-T-Zell-Expansionsprotokoll an Tag 7 durchlaufen hatten. Zunächst wurde die Hauptpopulation der lebenden T-Zellen (a) sowie daraus im nächsten Schritt die Einzelzellen (b, c) ausgewählt. In der Hauptpopulation wurden mindestens 10 000 lebende Zellen (englisch *events*) gemessen. Im Vergleich zu der nicht-transduzierten LNGFR-negativen Kontrollpopulation als Referenz wurde die LNGFR-Expression (und damit die AdCAR-Expression) der transduzierten T-Zellen bestimmt (d). Die LNGFR-positiven T-Zellen wurden entsprechend ihrer CD8 (APC Vio770)- und CD4 (BUV 395)-Expression in CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen aufgetrennt (e); FC-Analyse mit BD™ LSR II Flow Cytometer; FC-Auswertung mit FlowJo 10.4 und Excel; Ergebnis: LNGFR-Expression: 33 %, CD4-Expression: 48,3 %, CD8-Expression: 47,9 %.

2.5.7 LNGFR⁺-T-Zellen-Isolierung

Bei einer LNGFR Expression < 50 % wurden die AdCAR-T-Zellen mittels MACS isoliert. Die positive Selektion der LNGFR⁺-T-Zellen orientierte sich an dem Datenblatt von Miltenyi Biotec für LNGFR-*MicroBeads* und wurde entsprechend des Protokolls in Kapitel 2.4.1 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Magnetsäule viermal mit MACS-Puffer gespült wurde. Die AdCAR-T-Zellen wurden daraufhin auf eine Zelldichte von 3 bis 4 Millionen/mL eingestellt.

2.6 Zytotoxizitätsassays

Es erfolgte eine Normalisierung der AdCAR-T-Zellen anhand der LNGFR-Expression. Ziel war eine gleiche Anzahl von AdCAR-T-Zellen pro *Well*. Die AdCAR-T-Zellen wurden 72 Stunden vor Beginn des Experiments in zytokinfreies Zellmedium überführt (siehe Kapitel 2.2.5). Jedes Experiment wurde mit AdCAR-T-Zellen von gesunden Donoren (D1, D2, D3 oder D6) mindestens dreimal (n=3) durchgeführt. Als Medium wurde das Kulturmedium der jeweiligen Tumorzelllinie verwendet (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2).

2.6.1 Luciferase-basiertes Zytotoxizitätsassay

Luciferase ist ein natürlich vorkommendes Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Bei der katalysierten Reaktion wird das Substrat D-Luciferin unter Verbrauch von ATP gespalten. Die bei der exothermen Reaktion freiwerdende Energie wird als gelb-grünes Licht sichtbar und ist im Luminometer bei einer Wellenlänge von 550-570 nm messbar [159]. Die Lichtemission ist proportional zur Luciferase-Aktivität, die von der Anzahl der Luciferase-enthaltenden, lebenden Tumorzellen abhängt. Auf diese Weise wurde die Zellzahl gemessen und die prozentuale Tumorlyse berechnet.

2.6.1.1 Durchführung

Grundlage des Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays (englisch *luciferase based cytotoxicity assay*, LCA) war eine lichtabschirmende 96-Well-Flachboden-Platte. Das Endvolumen pro *Well* betrug 200 μ L.

Tabelle 2.10: Grundaufbau eines Pipettierschemas

	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													

Auf die leer dargestellten *Wells* (siehe Tabelle 2.10) wurden unterschiedliche Konditionen verteilt und dabei für jede Kondition drei *Wells* als technische Replikate angesetzt. Die Grundzusammensetzung bestand aus jeweils 50 µL Tumor-Target-Zellen, LLE-mAb, 72h-zytokinfreien AdCAR-T-Zellen und D-Luciferin. Bei den Kontrollen wurde der fehlende Teil durch Medium ersetzt (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der verschiedenen Versuchsbedingungen

Kondition	Zusammensetzung
0 % - Kontrolle (Mediumkontrolle)	150 µL Medium 50 µL D-Luciferin
10 % -, 25 % -, 50 % -, 75 % -, 100 % - Target-Kontrolle	50 µL Tumorzellen (jeweilige Verdünnung) 100 µL Medium 50 µL D-Luciferin
Kein LLE-mAb	50 µL Tumorzellen 50 µL AdCAR-T-Zellen 50 µL Medium 50 µL D-Luciferin
Versuchsbedingungen	50 µL Tumorzellen 50 µL AdCAR-T-Zellen 50 µL LLE-mAb 50 µL D-Luciferin

Zunächst wurden pro *Well* 50 µL Tumorzellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL (50 000 Target-Zellen pro *Well*) pipettiert. Bei der Target-Titration 75 %, 50 %, 25 %, 10 % wurden die Tumorzellen vor dem Pipettieren entsprechend mit Medium verdünnt. Bei der 0 % - Kontrolle wurde nur Medium in die *Wells* pipettiert. Als nächstes wurden 50 µL LLE-mAb, dessen Konzentration je nach Kondition variierte, in die *Wells* pipettiert. In die reinen Target-Kontrollen und die Kondition „Kein LLE-mAb“ wurden stattdessen 50 µL Medium hinzugegeben. Je nach gewünschter LLE-mAb-Konzentration in 200 µL Endvolumen pro *Well* wurde eine entsprechende Antikörpermenge in Medium aufgenommen. Daraufhin wurden 50 µL AdCAR-T-/Effektor-Zellen in die *Wells* pipettiert. Je nach Effektor:Target (E:T)-Ratio variierte ihre Konzentration zwischen 2 Millionen/mL bei den Target-Zelllinien JeKo-1 und Nalm-6 (100 000 AdCAR-T-Zellen

pro Well), 1 Million/mL bei der Zelllinie LS (50 000 AdCAR-T-Zellen pro Well) und 5 Millionen/mL bei der Zelllinie HS-578T (250 000 AdCAR-T-Zellen pro Well). Zuletzt wurden unter möglichst geringer Lichteinstrahlung in jedes Well 50 µL von dem in Medium gelöstem D-Luciferin mit einer Konzentration von 1 µg/mL pipettiert. Dabei wurde je ein 50 µL-Aliquot von synthetischem in DMSO gelöstem D-Luciferin mit der Konzentration 0,1 µg/µL in 5 mL Medium gelöst. Die Endkonzentration im Well betrug 0,25 µg/mL. Die Luciferase-Platten wurden im Dunkeln im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und die Biolumineszenz der Target-Zellen nach 24, 48 und teilweise nach 72 Stunden mit dem Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) bei 37 °C gemessen.

2.6.1.2 Aufbau der verschiedenen Experimente

1. Effektor:Target-Titration

Ziel der E:T-Titration war es, für die weiteren Experimente das optimale Effektor:Target-Verhältnis herauszufinden, bei dem die spezifische Tumorlyse durch den entsprechenden Antikörper sehr hoch (> 50 %) und die unspezifische Tumorlyse durch den Kontrollantikörper möglichst niedrig war.

Bei den Suspensionszelllinien wurden die AdCAR-T-Zellen zu den Target-Zellen in einem Verhältnis von 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und bei den adhärennten Zelllinien in einem Verhältnis von 10:1, 5:1, 2,5:1, 2:1, 1:1, 0,5:1 pipettiert (siehe Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Pipettierschema der E:T-Titration (am Beispiel von JeKo-1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 % - Kontrolle	LLE-CD19 mAb E:T=10:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=10:1		100 % - Kontrolle		100 % - Kontrolle				100 % - Kontrolle
B		LLE-CD19 mAb E:T=5:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=5:1				75 % - Kontrolle				
C		LLE-CD19 mAb E:T=2:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=2:1				50 % - Kontrolle				
D		LLE-CD19 mAb E:T=1:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=1:1				25 % - Kontrolle				
E		LLE-CD19 mAb E:T=0,5:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=0,5:1				10 % - Kontrolle				
F		LLE-CD19 mAb E:T=0,25:1		LLE-mAb-Kontrolle E:T=0,25:1				0 % - Kontrolle				
G		kein LLE-mAb E:T=10:1		kein LLE-mAb E:T=5:1				kein LLE-mAb E:T=2:1				
H		kein LLE-mAb E:T=1:1		kein LLE-mAb E:T=0,5:1				kein LLE-mAb E:T=0,25:1				

Die E:T-Titration erfolgte in Kombination mit einem hoch exprimierten Antikörper. Bei den B-phänotypischen Tumorzelllinien wurde LLE-CD19 mAb, bei der Brustkrebszelllinie HS-578T LLE-EGFR mAb und bei der Neuroblastomzelllinie LS LLE-CD276 mAb verwendet. Zur Kontrolle erfolgte die E:T-Titration zusätzlich mit dem biotinylierten Kontrollantikörper REA Control, der die Effektor-Zellen unspezifisch aktiviert, und ohne LLE-mAb. Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 ng/mL pipettiert.

Alle weiteren Konditionen wurden, wie in Kapitel 2.6.1.1 beschrieben, pipettiert.

Aus den Experimenten von vorherigen Doktorandinnen und Doktoranden ging hervor, dass die Lysewerte der E:T-Titration nur geringfügig durch die unterschiedlichen Donoren beeinflusst wurden.

2. LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

Mit der im Vorversuch festgelegten E:T-Ratio wurden nun je Tumorzelllinie vier bis sechs LLE-mAb in den Konzentrationen 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,01 ng/mL und 0,001 ng/mL pipettiert (siehe Tabelle 2.13). Ziel war es, für jeden LLE-mAb die Schwellenwertkonzentration zu ermitteln, unterhalb welcher die Interaktion zwischen Target- und Effektor-Zellen durch das Adaptermolekül nicht mehr erfolgen konnte. Unter dieser Konzentration war die induzierte Tumorlyse sehr gering oder entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper.

Tabelle 2.13: Pipettierschema der LLE-mAb-Titration (am Beispiel von JeKo-1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 % - Kontrolle	LLE-CD19 mAb 100 ng/ml		LLE-CD20 mAb 100 ng/ml		100 % - Kontrolle	100 % - Kontrolle			100 % - Kontrolle		
B		LLE-CD19 mAb 10 ng/ml		LLE-CD20 mAb 10 ng/ml			75 % - Kontrolle					
C		LLE-CD19 mAb 1 ng/ml		LLE-CD20 mAb 1 ng/ml			50 % - Kontrolle					
D		LLE-CD19 mAb 0,1 ng/ml		LLE-CD20 mAb 0,1 ng/ml			25 % - Kontrolle					
E		LLE-CD19 mAb 0,01 ng/ml		LLE-CD20 mAb 0,01 ng/ml			10 % - Kontrolle					
F		LLE-CD19 mAb 0,001 ng/ml		LLE-CD20 mAb 0,001 ng/ml			0 % - Kontrolle					
G		kein LLE-mAb		kein LLE-mAb			100 % - Kontrolle					
H		LLE-mAb-Kontrolle 100ng/ml		LLE-mAb-Kontrolle 10ng/ml								

3. LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

Im folgenden Schritt wurden die LLE-mAb in einem Bereich um die Schwellenwertkonzentration zum Beispiel in den Konzentrationen 1000 pg/mL, 250 pg/mL, 100 pg/mL, 75 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL und 10 pg/mL pipettiert. Ziel war es, den genauen Schwellenwert herauszufinden.

4. LLE-mAb-Kombinationen

In den weiteren Versuchen wurden drei bis vier LLE-mAb ausgewählt, die in den Vorversuchen bei der jeweiligen Target-Zelllinie eine gute Tumorlyse erzielten. Es wurden verschiedene, möglichst niedrige Konzentrationen pro LLE-mAb ausgewählt, von denen die höchste Konzentration zu einer guten Tumorlyse und die niedrigste zu keiner relevanten Tumorlyse führten. Die LLE-mAb wurden jeweils einzeln und in Kombination mit den anderen LLE-mAb pipettiert.

Bei einer Kombination von vier Antikörpern mit einer jeweiligen Konzentration von beispielsweise 10 pg/mL wurden von jedem Antikörper 12,5 µL der vorher gemischten Konzentration von 40 pg/mL pro *Well* pipettiert, um am Ende zu einem Volumen von 50 µL Antikörper zu gelangen.

2.6.1.3 Auswertung

Die Berechnung der durch die AdCAR-T-Zellen induzierten Tumorlyse erfolgte in einer vorgefertigten Auswertungstabelle in Excel, in der die jeweiligen Rohdaten (englisch *counts*) der Messungen eingetragen wurden. Die prozentuale Lyse wurde mit Hilfe einer Ausgleichsgerade aus den Mittelwerten der Target-Kontrollen (0 % - 100 %) berechnet (siehe Abbildung 2.7). Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Zunahme des Biolumineszenz-Signals und somit einer Proliferation der Zellen.

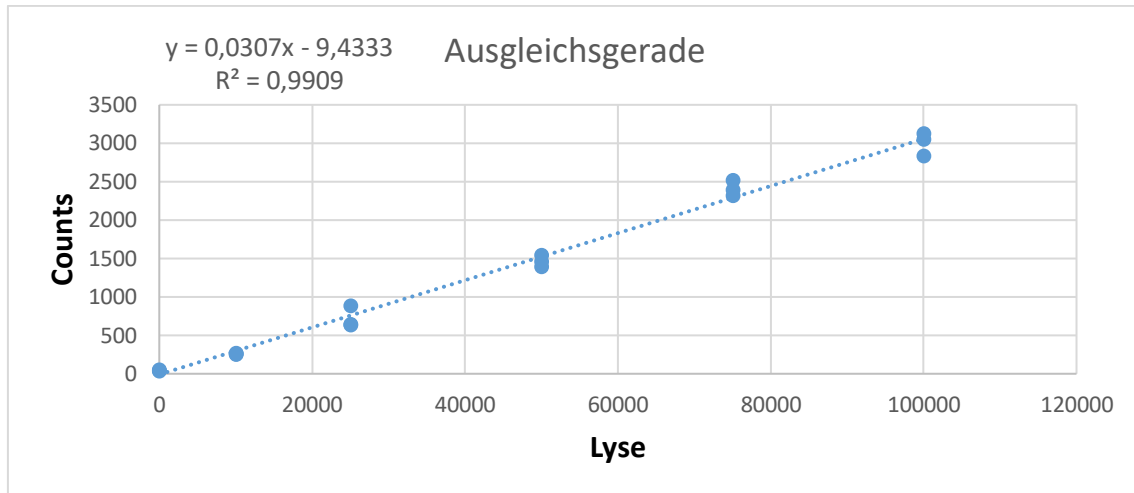


Abbildung 2.7: Excel Auswertung - Ausgleichsgerade

Bei der Auswertung einer Messung wurde anhand der Target-Kontrollen (0 % - 100 %) die prozentuale Tumorlyse der verschiedenen Konditionen berechnet. Die 100%ige Lyse entsprach der 0 % - Target-Kontrolle (0 counts) und die 0%ige Lyse der 100 % - Target-Kontrolle (hier 3000 counts).

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit der Software GraphPad Prism 8. Mit der Analyseart One-way ANOVA (analysis of variance), post-Test-Tukey wurden verschiedene spezifische Lysewerte mit der unspezifischen Lyse durch den Kontrollantikörper verglichen und auf einen signifikanten Unterschied hin untersucht. In den Graphiken wurde die Signifikanz zwischen den Konditionen über den jeweiligen Balken markiert. Signifikante Unterschiede sind mit **** (p < 0,0001), *** (p < 0,001), ** (p < 0,01) und * (p < 0,05) dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in LCA nur LLE-mAb-Konditionen markiert, die zu einer signifikant höheren Zellyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper führten.

2.6.2 Durchflusszytometrie-basiertes Zytotoxizitätsassay

2.6.2.1 Durchführung

Grundlage des Versuchs war eine 48-Well-Flachboden-Platte. Das Endvolumen pro Well betrug 500 µL. Die Grundzusammensetzung bestand aus jeweils 100 µL Target-Zellen, LLE-mAb, 72h-zytokinfreien AdCAR-T-Zellen und 200 µL Medium. Bei den Kontrollen wurde der fehlende Teil durch Medium ersetzt.

Zunächst wurden pro *Well* 100 μ L Target-Zellen mit einer Dichte von 1 Million/mL pipettiert (100 000 Tumorzellen pro *Well*). Bei den Versuchen mit Jeko-1 wurden jeweils 25 μ L (25 000 Zellen von jeder JeKo-1 Zelllinie) pro *Well* pipettiert.

Als nächstes wurden 100 μ L LLE-mAb, dessen Konzentration je nach Kondition variierte, in die *Wells* pipettiert. Je nach gewünschter LLE-mAb-Konzentration in 500 μ L Endvolumen pro *Well* wurde eine entsprechende Antikörpermenge in Medium aufgenommen (siehe Tabelle 2.6 in Kapitel 2.1.4.2).

Bei der Kombination zweier LLE-mAb mit einer jeweiligen Konzentration von beispielsweise 10 pg/mL wurden jeweils 50 μ L aus der Mischung mit einer Konzentration von 20 ng/mL entnommen und bei der Kombination dreier LLE-mAb wurden 33,33 μ L aus der Mischung mit einer Konzentration von 30 ng/mL entnommen.

In die reinen Target-Kontrollen und die Kondition „*Target + AdCAR*“ wurden stattdessen 100 μ L Medium pipettiert.

Daraufhin wurden 100 μ L AdCAR-T-Zellen in die *Wells* pipettiert. Entsprechend der zuvor in einem LCA ermittelten E:T-Ratio von 2:1 betrug ihre Konzentration bei den Target-Zelllinien JeKo-1 und Nalm-6 2 Millionen/mL (200 000 AdCAR-T-Zellen pro *Well*).

In die reinen Target-Kontrollen wurden stattdessen 100 μ L Medium hinzugegeben.

Zuletzt wurden 200 μ L Medium in jedes *Well* pipettiert.

Die 48-Well-Platte wurde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 24, 48 und teilweise 72 Stunden wurde eine FC-Primärfärbung und -Messung der *Wells* durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Dabei wurde jedes *Well* vorsichtig in ein FC-Tube überführt und mit 500 μ L Kulturmedium gespült.

Nach der FC-Färbung wurden zur Normalisierung der gemessenen Zellzahl 20 μ L Kompensations-Beads in jedes FC-Tube pipettiert. Die FC-Messung wurde nach 100 000 gezählten *Events* innerhalb des *Beads-Gates* unabhängig von der Zellzahl beendet.

Sequenzielles Targeting (am Beispiel von JeKo-1)

In ausgewählte *Wells* wurden nach 48 Stunden neue LLE-mAb hinzugefügt, sodass weitere Zielantigen-positive Target-Zellen lysiert wurden. Das Endvolumen betrug 800 μ l pro *Well*.

Von jedem LLE-mAb wurden 100 μ L aus der Mischung mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL in die gekennzeichneten *Wells* pipettiert. Zuletzt wurden in alle *Wells* 200 μ L Medium hinzugegeben.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte eine FC-Messung.

Zusatz von PBMC oder frisch isolierten peripheren B-Zellen

Bei den Versuchen mit Nalm-6 wurden in die *Wells* je nach Kondition 100 μ L mit jeweils 300 000 autologen, frisch isolierten PBMC oder 100 000 peripheren B-Zellen hinzugefügt.

Die positive Selektion der CD19-positiven peripheren B-Zellen aus den PBMC orientierte sich an dem Datenblatt von Miltenyi Biotec für REAleaseTM CD19 MicroBeads und wurde entsprechend des Protokolls in Kapitel 2.4.1 durchgeführt.

Relevant war, dass die REAleaseTM-Technologie die Dissoziation aller *MicroBeads* von der Zelloberfläche erleichterte und sicherstellte, dass keine Epitope für das weitere *Targeting* verdeckt wurden.

2.6.2.2 Auswertung

Die FC-Daten wurden aus der Software FC-Diva als fcs-Dateien exportiert und mit FlowJo 10.4 und Excel ausgewertet (siehe Kapitel 2.3.2). Anhand der Referenzkontrollen wurden die Rohdaten (englisch *counts*) normalisiert und die prozentuale Lyse der verschiedenen Konditionen berechnet.

Die verschiedenen Zellpopulationen wurden anhand von spezifischen Antigenen, wie in Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9 gezeigt, voneinander abgegrenzt. Bei Experimenten mit PBMC wurden die CD3- und Luciferase-mCherry-negativen Zellen erneut entsprechend der CD10- und CD19-Expression aufgetrennt, um die B-Zellen zu identifizieren.

Mit dem Programm GraphPad Prism 8 wurden die prozentualen Werte der Tumorlyse in eine Graphik umgesetzt.

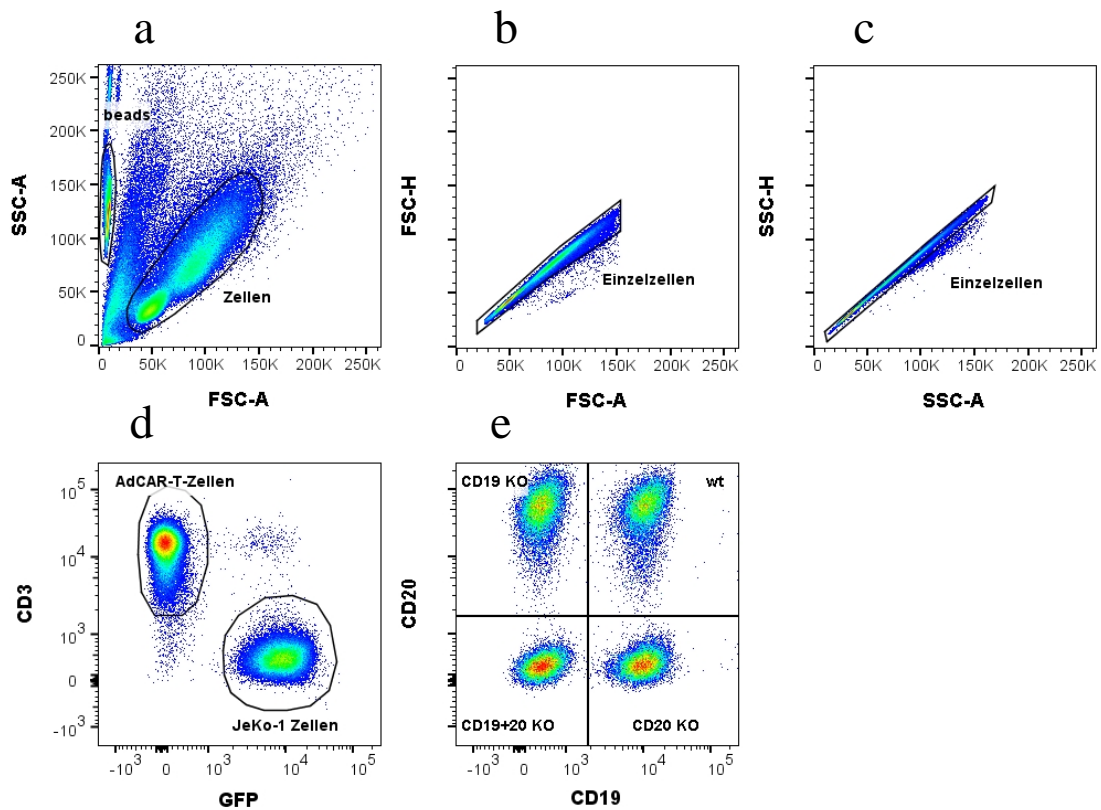


Abbildung 2.8: FlowJo-Gating Strategie bei Experimenten mit JeKo-1 Zelllinien

Durchflusszytometrische Analyse von JeKo-1 Zellen und Kompensations-Beads. Die Hauptpopulation der lebenden Zellen und die *Beads* wurden ausgewählt (a), Beendigung der Messung nach 100 000 gezählten *Events* innerhalb des *Beads-Gates* zur Normalisierung der gemessenen Zellzahl. Von den lebenden Zellen wurden wiederum die Einzelzellen markiert (b, c). Die JeKo-1 Zellen wurden anhand der Luciferase (Luc)-GFP-Expression und die AdCAR-T-Zellen anhand der CD3 (VioBlue)-Expression selektioniert (d). Innerhalb der JeKo-1 Zellen wurden die verschiedenen Zelllinien anhand ihrer CD19 (APC)- und CD20 (PE)-Expression identifiziert (e). JeKo-1 Wildtyp (wt) war CD19- und CD20-positiv, während bei den JeKo-1 Knockout (KO)-Varianten das entsprechende Antigen fehlte; FC-Analyse mit BD™ LSR II Flow Cytometer; FC-Auswertung mit FlowJo 10.4 und Excel.

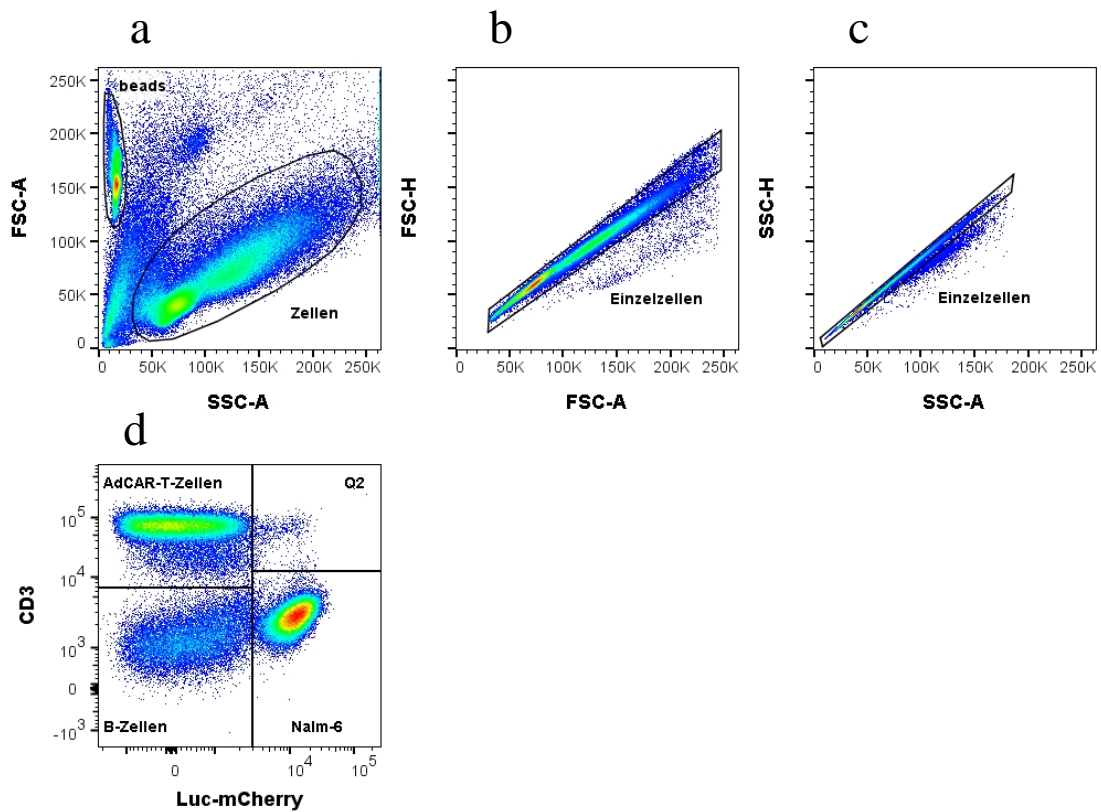


Abbildung 2.9: FlowJo-Gating Strategie bei Experimenten mit Nalm-6/gesunden B-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse von Nalm-6 Zellen, frisch isolierten, gesunden B-Zellen, AdCAR-T-Zellen und Kompensations-Beads Die Hauptpopulation der lebenden Zellen und die *Beads* wurden ausgewählt (a), Beendigung der Messung nach 100 000 gezählten *Events* innerhalb des *Beads-Gates* zur Normalisierung der gemessenen Zellzahl. Von den lebenden Zellen wurden wiederum die Einzelzellen markiert (b, c). Die Nalm-6 Zellen wurden anhand der Luciferase (Luc)-mCherry-Expression und die AdCAR-T-Zellen anhand der CD3 (VioBlue)-Expression selektioniert (d). Die gesunden B-Zellen waren CD3- und Luc-mCherry-negativ (d); FC-Analyse mit BD™ LSR II Flow Cytometer; FC-Auswertung mit FlowJo 10.4 und Excel.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolle der Luciferase-Expression transduzierter Tumorzelllinien

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Transduktionseffizienz der verwendeten fluoreszierenden Tumorzelllinien, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1 dargestellt.

Die Zelllinie Nalm-6 war zu 98 %, LS zu 99 % und HS-578T zu 100 % Luc-mCherry-positiv. Die Zelllinie JeKo-1 war zu 100 % Luc-GFP-positiv. Da die Zellen der Zelllinie Nalm-6 nach dem Auftauen zunächst nur zu etwa 85 % Luc-mCherry-positiv waren, mussten die transduzierten Zellen mittels FC selektioniert werden. Es war von einer ausreichenden und stabilen Luciferase-Expression für die Verwendung der Zelllinien in LCA auszugehen.

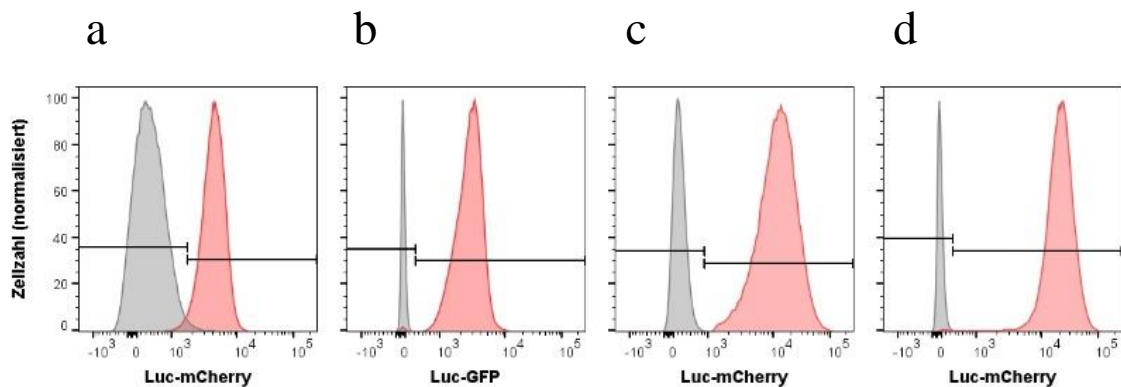


Abbildung 3.1: Luciferase-Expression der Tumorzelllinien

Die Fluoreszenzintensität der transduzierten Luciferase-exprimierenden Tumorzellen (rot) der Zelllinien Nalm-6 (a), JeKo-1 wt (b), LS (c) und HS-578T (d) wurde durchflusszytometrisch bestimmt und mit nicht-transduzierten Zellen der Kontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

Tabelle 3.1: Prozentuale Luciferase-Expression und MFIR-Ratio der Tumorzelllinien

Die Luciferase-Expression der Tumorzelllinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

Zelllinie	Luciferase	
	Expression (%)	MFIR
Nalm-6	98	11
JeKo-1 wt	100	47
LS	99	51
HS-578T	100	313,3

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFIR			
> 20	< 20	< 5	< 2

3.2 Antigenexpression der Tumorzelllinien

Mittels Durchflusszytometrie wurde die relative Antigenexpression der verschiedenen Tumorzelllinien, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 3.2-Abbildung 3.5 und Tabelle 3.2-Tabelle 3.5 dargestellt. Die MFIR der Antigene geben Informationen darüber, wie häufig die einzelnen Antigene auf den Zellen exprimiert werden.

3.2.1 Nalm-6 (BCP-ALL)

Die Antigene CD19, CD10 und CD138 wurden auf über 95 % der Zellen der Zelllinie Nalm-6 exprimiert, das Antigen CD22 wurde auf 65 % der Zellen exprimiert (siehe Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2).

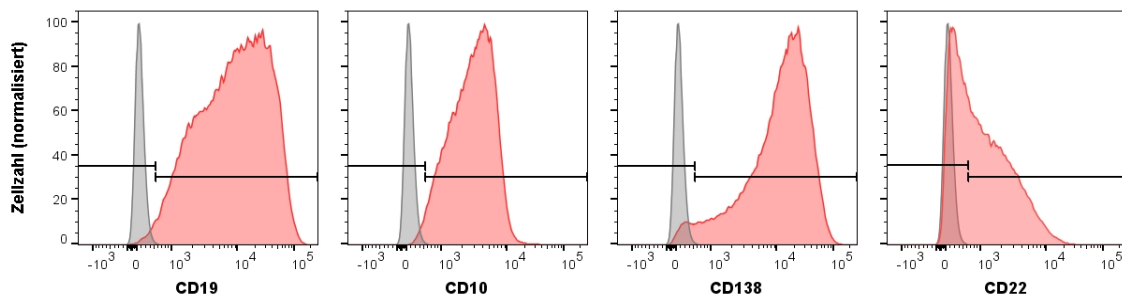


Abbildung 3.2: Antigenexpression der Nalm-6 Zellen

Die Expression der Antigene CD19, CD10, CD138 und CD22 auf Nalm-6 Zellen (rot) wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Isotypkontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

Tabelle 3.2: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der Nalm-6 Zellen

Die Expression der Antigene CD19, CD10, CD138 und CD22 auf Nalm-6 Zellen wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

	Nalm-6	
Antigen	Expression (%)	MFIR
CD19	99	57
CD10	99	18
CD138	97	79
CD22	65	5

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFIR			
> 20	< 20	< 5	< 2

3.2.2 JeKo-1 (B-NHL)

Das Antigen CD19 wurde von der gesamten Zellpopulation der Zelllinien JeKo-1 wt und JeKo-1 CD20 KO exprimiert. Auf den Zellen der Zelllinie JeKo-1 CD19 KO und CD19/20 KO ließ sich CD19 auf Grund des *Knockouts* nicht nachweisen (siehe Abbildung 3.3 und Tabelle 3.3).

Das Antigen CD20 wurde von der gesamten Zellpopulation der Zelllinien JeKo-1 wt und JeKo-1 CD19 KO exprimiert. Die Zelllinien JeKo-1 CD20 KO und CD19/20 KO exprimierten CD20 in sehr geringen Maßen.

Die weiteren untersuchten Antigene CD37, ROR-1 und CD79b wurden vergleichbar auf den Zellen der JeKo-1 Zelllinien exprimiert. Das Antigen CD22 wurde bei den Zelllinien mit CD19 KO bei nur 29 bis 44 % der Zellen exprimiert, während die Zellpopulation des Wildtyps zu 78 % CD22-positiv war. Das Antigen CD37 wurde bei den Zelllinien mit CD20 KO bei nur 82 bis 91 % der Zellen exprimiert, während die Zellpopulation des Wildtyps zu 98 % CD37-positiv war.

Tabelle 3.3: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der JeKo-1 Zelllinien

Die Expression der Antigene CD19, CD20, CD37, ROR-1, CD79b und CD22 auf JeKo-1 Zelllinien wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

Antigen	JeKo-1 wt		JeKo-1 CD19KO		JeKo-1 CD20KO		JeKo-1 CD19/20KO	
	Expression (%)	MFIR	Expression (%)	MFIR	Expression (%)	MFIR	Expression (%)	MFIR
CD19	100	364	0	1	100	290	0	1
CD20	100	1160	100	1250	14	2	1	1
CD37	98	162	99	157	82	33	91	44
ROR-1	100	376	100	421	100	320	100	342
CD79b	97	146	98	96	94	81	94	73
CD22	78	14	29	4	55	8	44	6

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFIR			
> 20	< 20	< 5	< 2

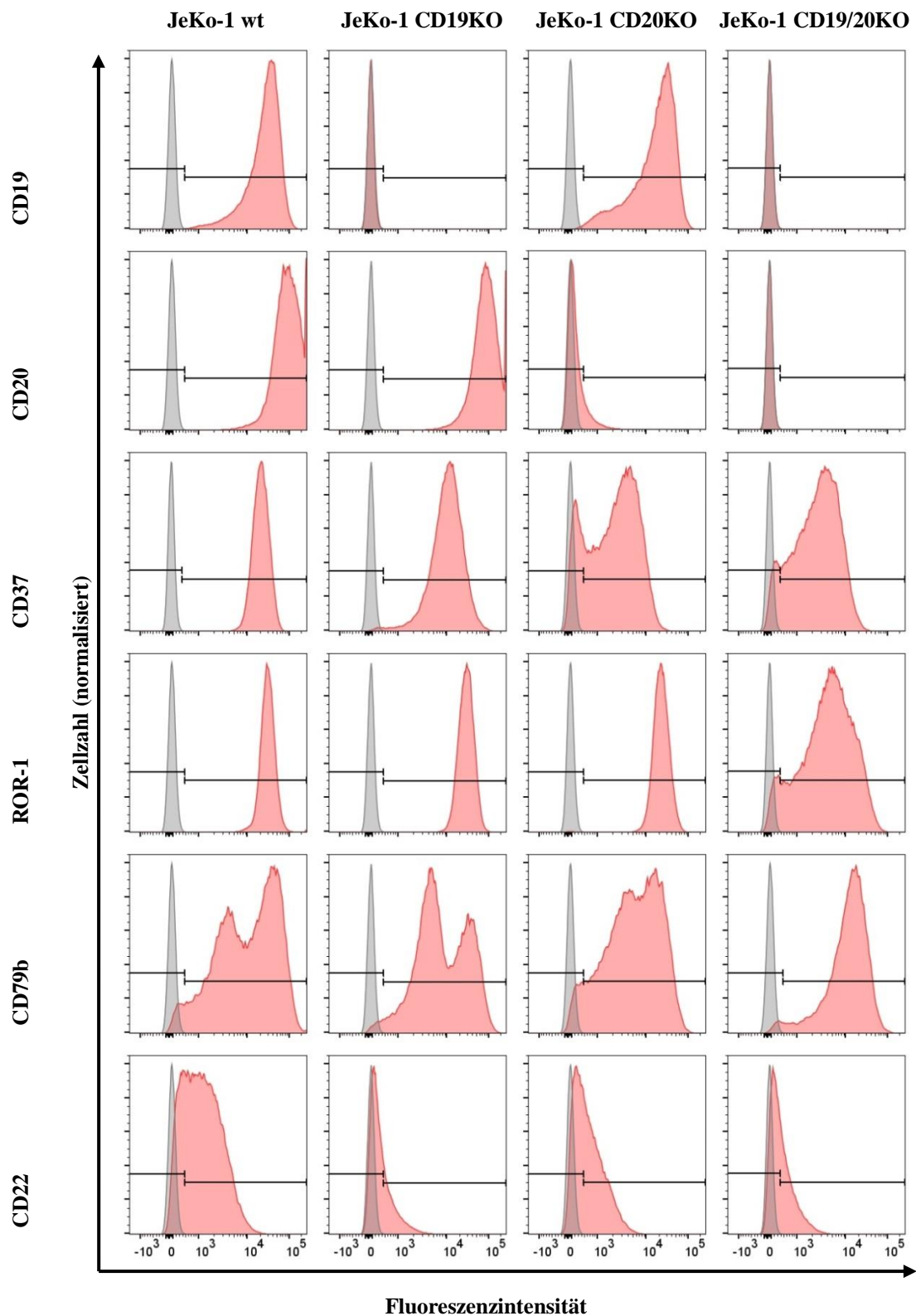


Abbildung 3.3: Antigenexpression der JeKo-1 Zelllinien

Die Expression der Antigene CD19, CD20, CD37, ROR-1, CD79b und CD22 auf JeKo-1 Zelllinien (rot) wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Isotypkontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

3.2.3 LS (Neuroblastom)

Die Zellpopulation der Zelllinie LS exprimierte die Antigene CD276 und CD117 zu 100 % und die Antigene CD171 sowie CD81 zu 91 %. Das Antigen GD2 konnte nur bei 42 % der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.4 und Tabelle 3.4).

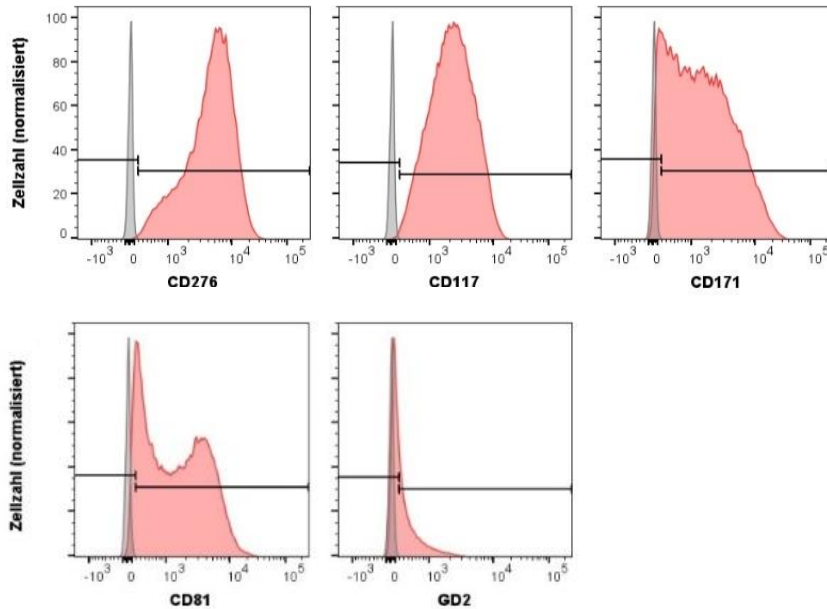


Abbildung 3.4: Antigenexpression der LS Zellen

Die Expression der Antigene CD276, CD117, CD37, CD171, CD81 und GD2 auf LS Zellen (rot) wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Isotypkontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

Tabelle 3.4: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der LS Zellen

Die Expression der Antigene CD276, CD117, CD37, CD171, CD81 und GD2 auf LS Zellen wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

Antigen	LS	
	Expression (%)	MFIR
CD276	100	245
CD117	100	110
CD171	91	66
CD81	91	67
GD2	42	8

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFIR			
> 20	< 20	< 5	< 2

3.2.4 HS-578T (Mammakarzinom)

Die Zellpopulation der Zelllinie HS-578T exprimierte die Antigene CD47 und CD276 zu über 99 %. Das Antigen EGFR konnte nur bei 6 %, das Antigen ROR-1 bei 79 % der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5 und Tabelle 3.5).

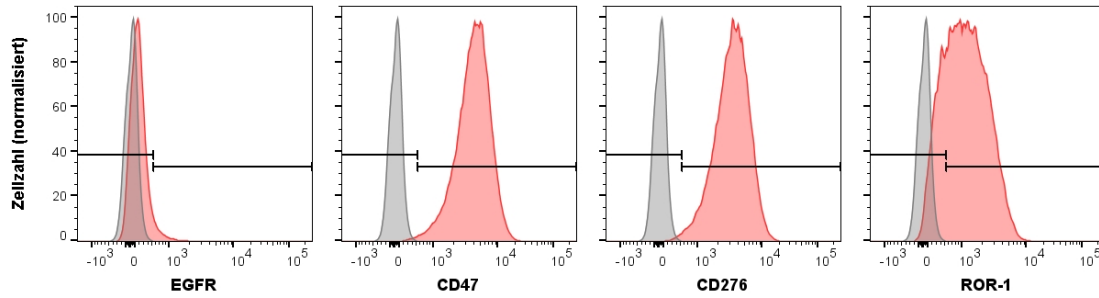


Abbildung 3.5: Antigenexpression der HS-578T Zellen

Die Expression der Antigene EGFR, CD47, CD276 und ROR-1 auf HS-578T Zellen (rot) wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Isotypkontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

Tabelle 3.5: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der HS-578T Zellen

Die Expression der Antigene EGFR, CD47, CD276 und ROR-1 auf HS-578T Zellen wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

Antigen	HS-578T	
	Expression (%)	MFI-R
EGFR	6	5
CD47	100	110
CD276	99	89
ROR-1	79	29

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFI-R			
> 20	< 20	< 5	< 2

3.3 Kontrolle der Herstellung der AdCAR-T-Zellen

Nach der Herstellung der AdCAR-T-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie stets eine Kontrolle der AdCAR-Expression, um zu eruieren, ob diese für die Experimente geeignet waren. Dafür wurde die Expression des koexprimierten Antigens LNGFR sowie der Oberflächenantigene CD8 und CD4 überprüft (siehe Tabelle 3.6). Die AdCAR-T-Zellen mit einer LNGFR-Expression > 50 % sowie mit einer

ausgeglichenen Verteilung der Oberflächenantigene CD8 und CD4 wurden für spätere Zytotoxizitätsassays verwendet. Bei einer LNGFR Expression < 50 % wurden die AdCAR-T-Zellen mittels MACS isoliert.

Tabelle 3.6: Überblick über die Expansionen der AdCAR-T-Zellen

Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der LNGFR/AdCAR-FC-Transduktionskontrolle. Die AdCAR-T-Zell-Expansionen mit einer LNGFR-Expression > 50 % sind in schwarz und < 50 % in grau dargestellt.

Expansion	Donor	Viruscharge	LNGFR-Expression (%)	CD4-Expression (%)	CD8-Expression (%)
1	D2	V No4 Lipo, E1, 10 µL	59,5	38,2	60,6
2	D1	V No4 Lipo, E2, 20 µL	20,9	40,9	57
3	D2	V No4 Lipo, E2, 50 µL	33	48,3	47,9
4	D1	V No4 Lipo, E1, 7 µL	67,8	34,5	64,6
5	D6	V No4 Lipo, E1, 10 µL	62	32	67,8
6	D2	V No4 Lipo, E1, 12,5 µL	11,7	0	64,7
7	D1	V No4 Lipo, E1, 15 µL	61,8	38,3	61,5
8	D6	V No4 Lipo, E1, 13 µL	36,9	18,1	81,4
9	D2	V No4 Lipo, E1, 20 µL	66	0	60,9
10	D1	V No4 Lipo, E1, 20 µL	59,6	31,5	67,6
11	D2	V No4 Lipo, E1, 22 µL	58,6	34	63,2
12	D2	V No4 Lipo, E1, 25 µL	0,5	36,9	48,3
13	D2	V No4 Lipo, E1, 8 µL	70,3	52	47,6
14	D6	V No4 Lipo, E1, 15 µL	38,8	11,3	84
15	D3	V No4 Lipo, E1, 20 µL	58,2	42,9	56,4
16	D3	V No4 Lipo, E1, 20 µL	71	38,6	60,5
17	D2	V No4 Lipo, E1, 14 µL	70,1	49,3	49,7
18	D1	V No4 Lipo, E1, 18 µL	71,4	36,1	63,3
19	D2	V No4 Lipo, E1, 22 µL	42,8	60,2	39,3
20	D1	V No4 Lipo, E1, 55 µL	47,4	48,6	48,5
21	D2	V No4 Lipo, E1, 50 µL	51,5	57,4	37,5

3.4 Luciferase-basierte Zytotoxizitätsassays

Die AdCAR-T-Zellen-vermittelte Zytotoxizität wurde zunächst in LCA nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit überprüft (Durchführung und Auswertung siehe Kapitel 2.6.1). Exemplarisch wurde die Fragestellung einer universellen Einsetzbarkeit des AdCAR-T-Zell-Systems an den Zelllinien Nalm-6 (BCP-ALL), JeKo-1 (Mantelzelllymphom), LS (Neuroblastom) und HS-578T (Mammakarzinom) untersucht.

Zunächst erfolgte eine E:T-Titration für jede Tumorzelllinie.

Ziel der E:T-Titrationen war es, für die weiteren Experimente das optimale Effektor:Target-Verhältnis zu finden, bei dem die spezifische Tumorlyse durch den entsprechenden LLE-mAb sehr hoch (> 50 %) und die unspezifische Tumorlyse durch den biotinylierten Kontrollantikörper möglichst niedrig war.

Entsprechend der ermittelten Antigenexpression (siehe Kapitel 3.2) und E:T-Ratio wurden bei jeder Tumorzelllinie verschiedene LLE-mAb in LCA eingesetzt. Jeder LLE-mAb wurde in verschiedenen Konzentrationen titriert.

Ziel war es, für jeden LLE-mAb diejenige Schwellenwertkonzentration herauszufinden, unterhalb welcher die Interaktion zwischen Target- und Effektor-Zellen durch den LLE-mAb nicht mehr signifikant erfolgen konnte, da zu wenige Antikörper zur Aktivierung der AdCAR-T-Zellen vorhanden waren. Unterhalb dieses Schwellenwertes war die spezifische Tumorlyse sehr gering, entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper oder es war sogar eine Proliferation der Tumorzellen zu beobachten.

Je nach Zelllinie und LLE-mAb lag die beobachtete Schwellenwertkonzentration im Bereich zwischen 0,001 und 1 ng/mL.

Zuletzt wurden die einzelnen LLE-mAb in jeweils subtherapeutischen Konzentrationen kombiniert. Die LLE-mAb-Kombinationen führten trotz sehr niedrigen einzelnen Antikörperkonzentrationen bei allen Tumorzelllinien zu einer hohen Tumorlyse.

3.4.1 Nalm-6 (BCP-ALL)

3.4.1.1 E:T-Titration

Das Verhältnis der Effektor- zu Target-Zellen wurde unter jeweils drei verschiedenen Bedingungen untersucht (siehe Abbildung 3.6).

Die E:T-Titration erfolgte unter Verwendung von LLE-CD19 mAb, der bei BCP-ALL als sehr guter Adapter für die AdCAR-T-Zellen angesehen werden kann [160, 161]. Zur Kontrolle erfolgte die E:T-Titration zusätzlich mit dem biotinylierten Kontrollantikörper (LLE-mAb-Kontrolle) und ohne LLE-mAb.

Mit LLE-CD19 mAb als AM war bei allen E:T-Ratios nach 24 und 48 Stunden eine Lyse der Target-Zellen zu beobachten. Die induzierte Lyse war außer bei der E:T-Ratio von 10:1 nach 48 Stunden bei allen Konditionen signifikant höher als bei den Kontrollen.

Nach 24 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T-Ratios von 2:1, 5:1 und 10:1 mit LLE-CD19 mAb 98 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 27 % und ohne LLE-mAb 1 %. Nach 48 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T-Ratios von 0,5:1, 1:1 und 2:1 mit LLE-CD19 mAb 99 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 24 % und ohne LLE-mAb 5 %.

Es wurde eine E:T-Ratio von 2:1 für alle weiteren Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie Nalm-6 festgelegt. Mit diesem Verhältnis betrug die durchschnittliche Tumorlyse nach 24 Stunden Inkubationszeit mit LLE-CD19 mAb 90 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (1 %) und ohne LLE-mAb (1 %). Nach 48 Stunden Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Tumorlyse mit LLE-CD19 mAb 100 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (43 %) und ohne LLE-mAb (21 %).

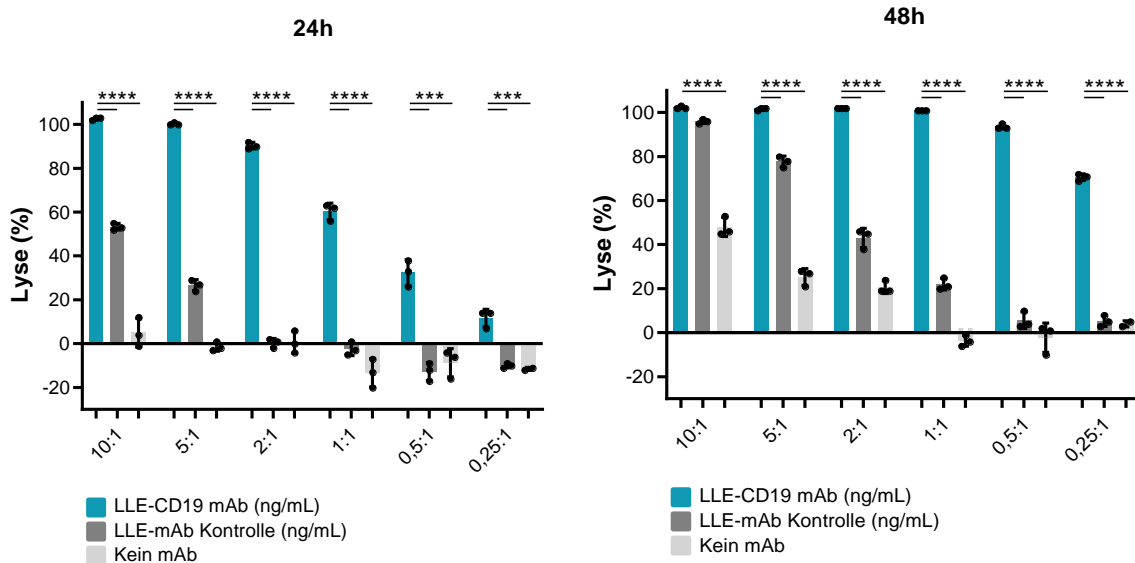


Abbildung 3.6: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - E:T-Titration

Die E:T-Titration (AdCAR-T-Zellen:Nalm-6 Zellen) wurde mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper LLE-CD19 mAb 10 ng/mL (türkis), mit einem Kontrollantikörper 10 ng/mL (dunkelgrau) und ohne Adaptermolekül (hellgrau) in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=1 mit drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.1.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

Entsprechend der ermittelten Antigenexpression (siehe Kapitel 3.2.1) wurden bei der Tumorzelllinie Nalm-6 die AM LLE-CD19 mAb, LLE-CD10 mAb, LLE-CD22 mAb und LLE-CD138 mAb in verschiedenen LCA eingesetzt (siehe Abbildung 3.7). Die AM wurden im Bereich von 0,001 bis 100 ng/mL titriert. Dabei variierte die induzierte Lyse der Target-Zellen zwischen den verschiedenen LLE-mAb deutlich. Die spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 100 ng/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD19 mAb bereits ab einer Konzentration von 0,01 ng/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (67,5 % vs. -9 %). Nach 48 Stunden konnte über den gesamten Titrationsbereich eine zunehmende Lyse der Target-Zellen verzeichnet werden. Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 22 % bei einer Konzentration von 0,001 ng/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL 100 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 48 %,

wodurch die Lyse durch LLE-CD19 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher (100 %) war als die Kontrolle.

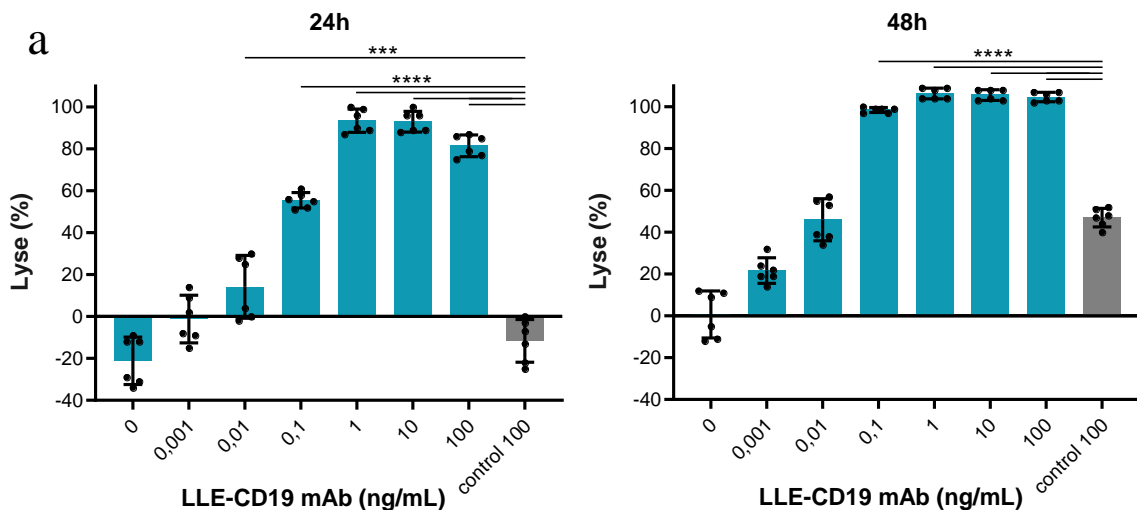
Nach 24 Stunden führte LLE-CD10 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (48 % vs. -9 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD10 mAb 54 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (98 % vs. 48 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-CD22 mAb ab einer Konzentration von 10 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (18 % vs. -9 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD22 mAb durchschnittlich 44 % bei einer Konzentration von 1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 10 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (77 % vs. 48 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-CD138 mAb ab einer Konzentration von 10 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (22 % vs. -9 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD138 mAb 55 % bei einer Konzentration von 1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 10 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (68 % vs. 48 %).

Unterhalb der Schwellenkonzentrationen der LLE-mAb war die spezifische Tumorlyse sehr gering, entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper oder es war sogar eine Proliferation der Tumorzellen zu beobachten.

Um die Schwellenkonzentration genauer definieren zu können, wurden alle LLE-mAb im nächsten Schritt in kleineren Konzentrationsunterschieden bis maximal 10 ng/mL titriert.



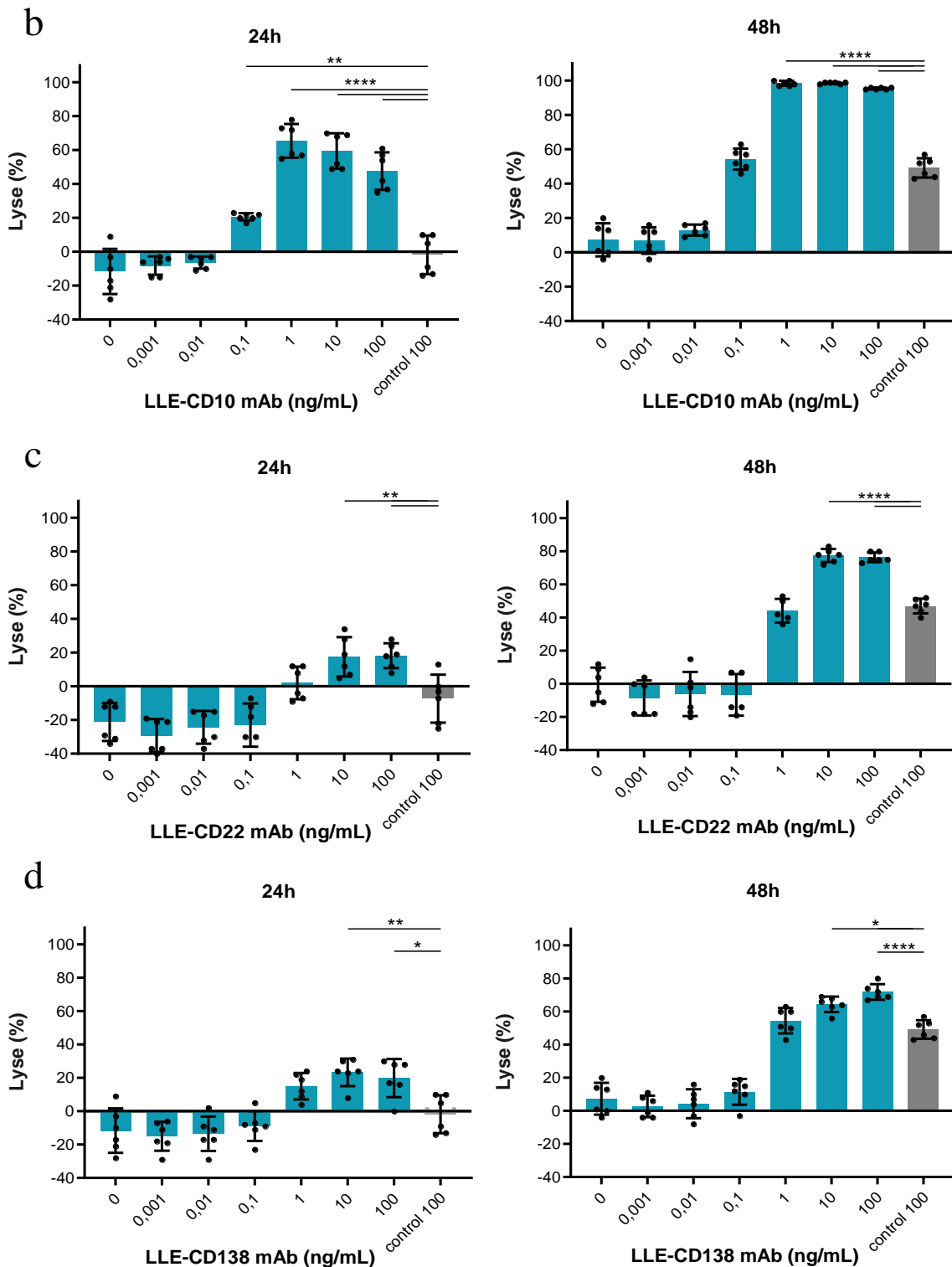


Abbildung 3.7: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) LLE-CD19 mAb (a), LLE-CD10 mAb (b), LLE-CD22 mAb (c) und LLE-CD138 mAb (d) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.1.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

Um die genaue Schwellenkonzentration zu ermitteln, wurden die Abstände zwischen den untersuchten Konzentrationen der Adaptermoleküle weiter verringert (siehe Abbildung 3.8). Die AM wurden im Bereich von 10 bis 1000 pg/mL bzw. im Fall von LLE-CD22 mAb bis 10 000 pg/mL titriert. Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 1000 pg/mL bzw. 10 000 pg/mL verglichen.

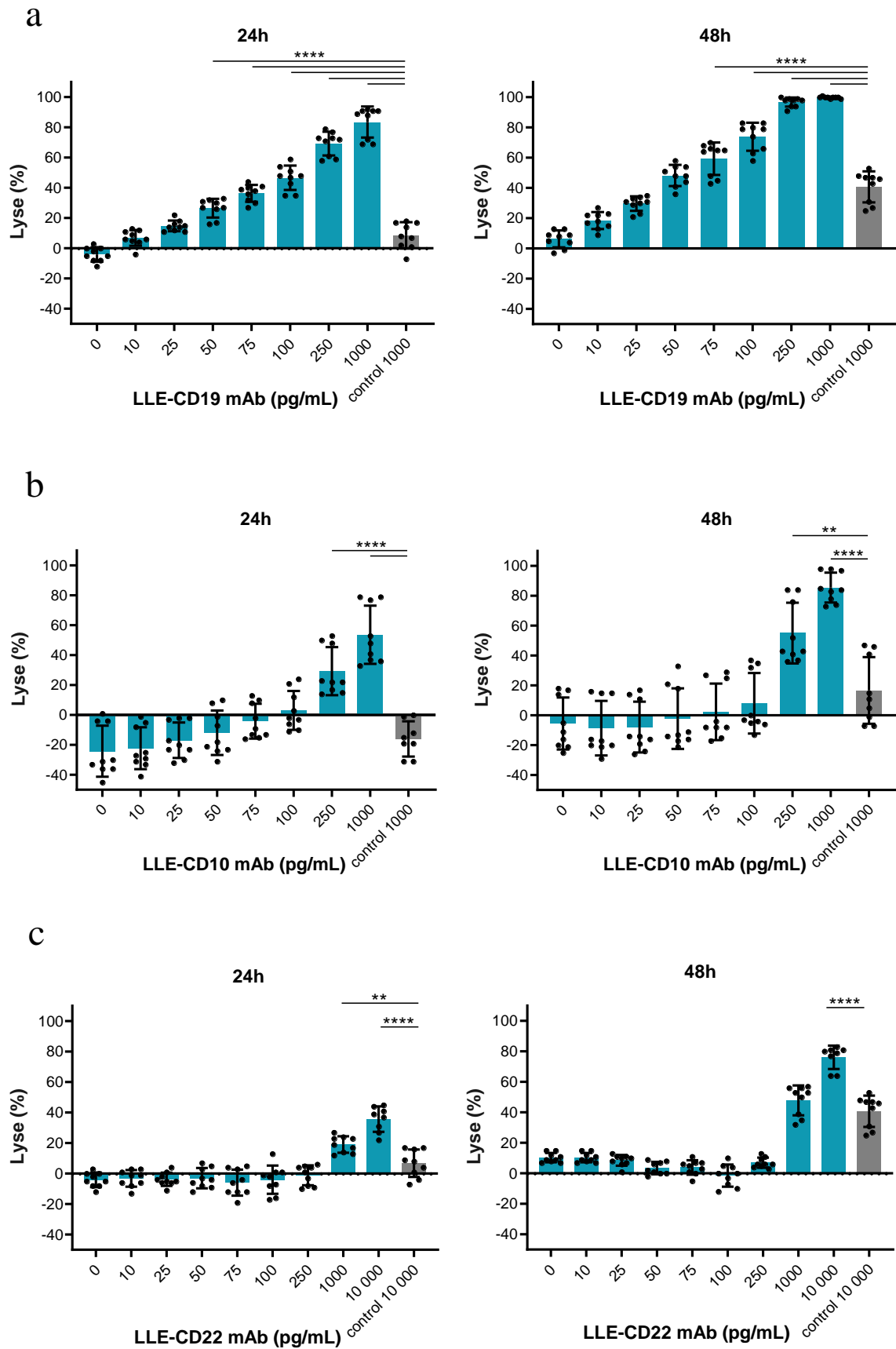
Mit LLE-CD19 mAb konnte im Gegensatz zu den anderen LLE-mAb über das gesamte Spektrum der Titration von 10 bis 1000 pg/mL eine Lyse der Target-Zellen induziert werden. Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD19 mAb bereits ab einer Konzentration von 50 pg/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (53 % vs. 9 %). Nach 48 Stunden konnte über den gesamten Titrationsbereich eine zunehmende Lyse der Target-Zellen verzeichnet werden. Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 30 % bei einer Konzentration von 25 pg/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 75 pg/mL 83 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 41 %, wodurch die Lyse durch LLE-CD19 mAb ab einer Konzentration von 75 pg/mL signifikant höher (83 %) war als die Kontrolle.

LLE-CD10 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 250 pg/mL nach 24 Stunden (39 % vs. -16 %) und nach 48 Stunden (71 % vs. 17 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD22 mAb ab einer Konzentration von 1000 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (29 % vs. 7 %). Nach 48 Stunden war die Tumorlyse durch LLE-CD22 mAb erst bei einer Konzentration von 10 000 pg/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (76 % vs. 41 %).

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD138 mAb mit einer Konzentration von 1000 pg/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (16 % vs. -16 %).

Für die LLE-mAb-Kombination wurden von den einzelnen LLE-mAb subtherapeutische Konzentrationen ausgewählt, die allein zu keiner signifikant höheren spezifischen Lyse im Vergleich zum Kontrollantikörper führten.



d

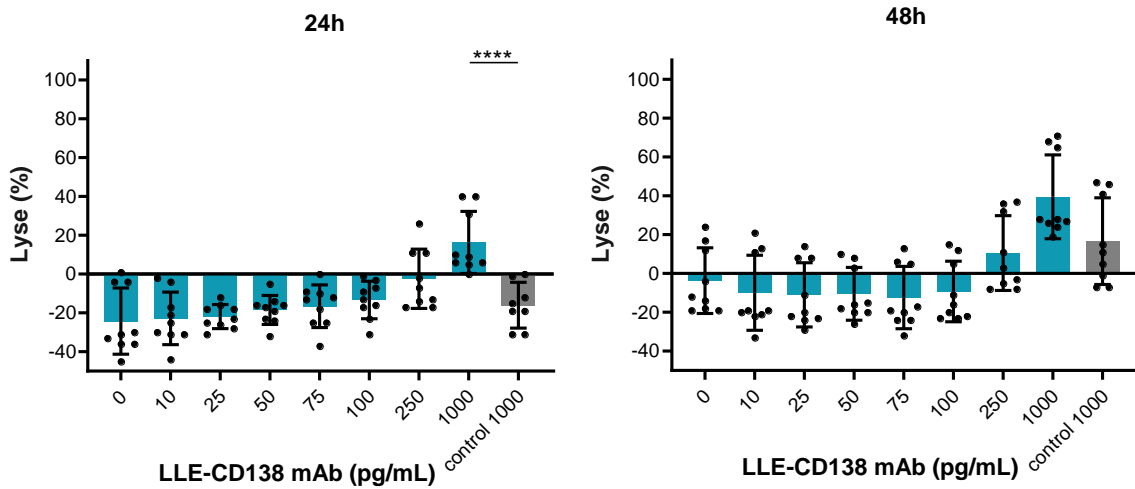


Abbildung 3.8: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** (a), **LLE-CD10 mAb** (b), **LLE-CD22 mAb** (c) und **LLE-CD138 mAb** (d) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.1.4 Multiples Targeting

LLE-CD19 mAb, LLE-CD22 mAb und LLE-CD138 mAb wurden jeweils mit der Konzentration 20 pg/mL und LLE-CD10 mAb mit der Konzentration 100 pg/mL in der LLE-mAb-Kombination eingesetzt (siehe Abbildung 3.9). Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 160 pg/mL und ohne LLE-mAb verglichen.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD19 mAb mit einer Konzentration von 20 pg/mL zu 11 % Lyse, LLE-CD10 mAb mit 100 pg/mL zu 7 % Lyse, LLE-CD22 mAb mit 20 pg/mL zur Proliferation (-16 % Lyse) und LLE-CD138 mAb mit 20 pg/mL zur Proliferation (-17 % Lyse) der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 160 pg/mL zur Proliferation der Target-Zellen (-10 % Lyse).

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 24 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 15 %.

Nach 48 Stunden führte LLE-CD19 mAb mit einer Konzentration von 20 pg/mL zu 12 % Lyse, LLE-CD10 mAb mit 100 pg/mL zu 14 % Lyse, LLE-CD22 mAb mit 20 pg/mL zur Proliferation (-2 % Lyse) und LLE-CD138 mAb mit 20 pg/mL zur Proliferation (-1 % Lyse) der Target-Zellen.

Der Kontrollantikörper führte mit 160 pg/mL zu durchschnittlich 3 % Lyse.

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 48 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 44 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

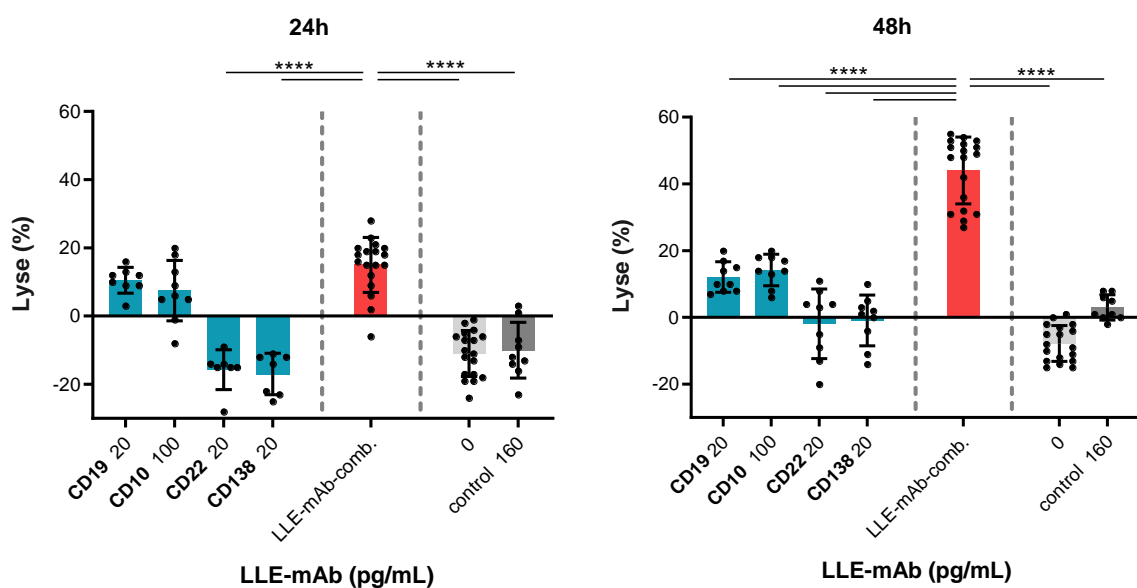


Abbildung 3.9: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6 Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb**, **LLE-CD22 mAb**, **LLE-CD138 mAb** und **LLE-CD10 mAb** einzeln (türkis) und in Kombination (rot) eingesetzt; Vergleich zu einem Kontrollantikörper (dunkelgrau) und einer Mediumkontrolle (hellgrau); E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten bzw. sechs technischen Replikaten bei den Konditionen „LLE-mAb-comb.“ und „0“; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.2 JeKo-1 (B-NHL)

3.4.2.1 E:T-Titration

In diesem Experiment wurde das Verhältnis von Effektor- zu Target-Zellen unter jeweils drei verschiedenen Bedingungen untersucht (siehe Kapitel 2.6.1.2).

Die E:T-Titration erfolgte zusammen mit LLE-CD19 mAb, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper (LLE-mAb-Kontrolle) und ohne LLE-mAb.

Mit LLE-CD19 mAb als AM war bei den E:T-Ratios von 0,5:1, 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1 nach 24 und 48 Stunden eine Lyse der Target-Zellen zu beobachten. Die induzierte Lyse war bei allen Konditionen signifikant höher als bei den Kontrollen.

Nach 24 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T-Ratios von 2:1, 5:1 und 10:1 mit LLE-CD19 mAb 68 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 21 % und ohne LLE-mAb -23 %. Nach 48 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T-Ratios von 0,5:1, 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1 mit LLE-CD19 mAb 95 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 36 % und ohne LLE-mAb 20 %.

Es wurde eine E:T-Ratio von 2:1 für alle weiteren Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie JeKo-1 wt festgelegt. Mit diesem Verhältnis betrug die durchschnittliche Tumorlyse nach 24 Stunden Inkubationszeit mit LLE-CD19 mAb 50 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (8 %) und ohne LLE-mAb (-22 %). Nach 48 Stunden Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Tumorlyse mit LLE-CD19 mAb 100 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (34 %) und ohne LLE-mAb (19 %).

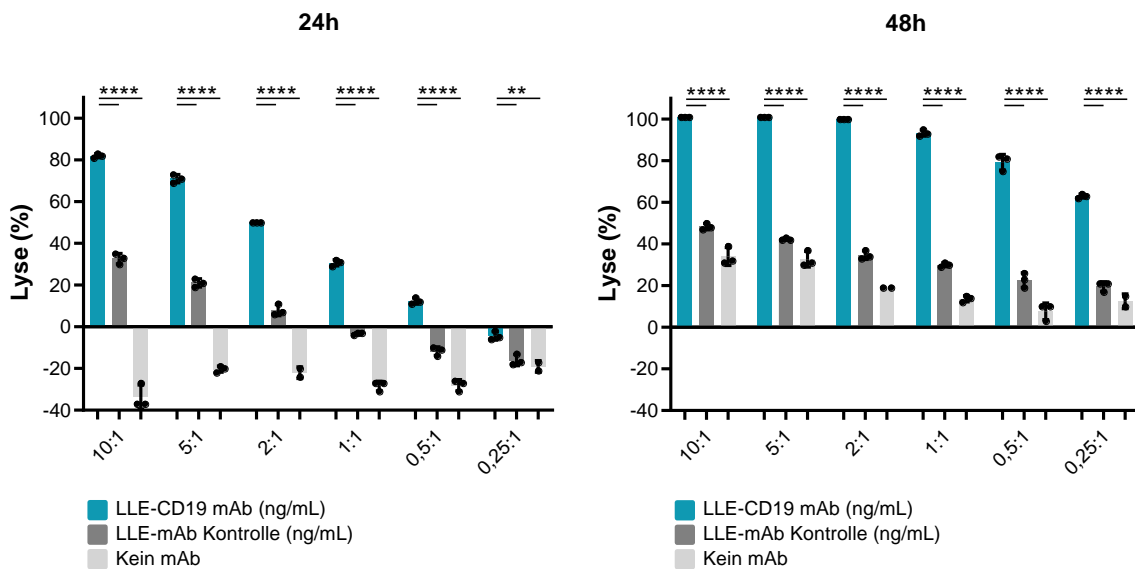


Abbildung 3.10: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - E:T-Titration

Die E:T-Titration (AdCAR-T-Zellen:JeKo-1 wt Zellen) wurde mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper LLE-CD19 mAb 10 ng/mL (türkis), mit einem Kontrollantikörper 10 ng/mL (dunkelgrau) und ohne Adaptermolekül (hellgrau) in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=1 mit drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.2.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

Entsprechend der ermittelten Antigenexpression (siehe Kapitel 3.2.2) wurden bei der Tumorzelllinie JeKo-1 wt LLE-CD19 mAb, LLE-CD20 mAb, LLE-CD37 mAb, LLE-ROR-1 mAb, LLE-CD79b mAb und LLE-CD22 mAb in verschiedenen LCA eingesetzt (siehe Abbildung 3.11). Die AM wurden im Bereich von 0,001 bis 100 ng/mL titriert. Dabei variierte die induzierte Lyse der Target-Zellen zwischen den verschiedenen LLE-mAb deutlich. Nach 48 Stunden konnte bei allen LLE-mAb über den gesamten Titrationsbereich eine zunehmende Lyse der Target-Zellen verzeichnet werden. Die spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 100 ng/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD19 mAb bereits ab einer Konzentration von 0,01 ng/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (29 % vs. -21 %). Die Lyse betrug nach 48 Stunden 46 % bei einer Konzentration von 0,01 ng/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL 90 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 37 %, wodurch die Lyse durch LLE-CD19 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher (90 %) war als die Kontrolle.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD20 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (41 % vs. -21 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD20 mAb 31 % bei einer Konzentration von 0,01 ng/mL und war ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (86 % vs. 37 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-CD37 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (22 % vs. -21 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD37 mAb 35 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (80 % vs. 37 %).

LLE-ROR-1 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL nach 24 Stunden (38 % vs. -21 %) und nach 48 Stunden (82 % vs. 37 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

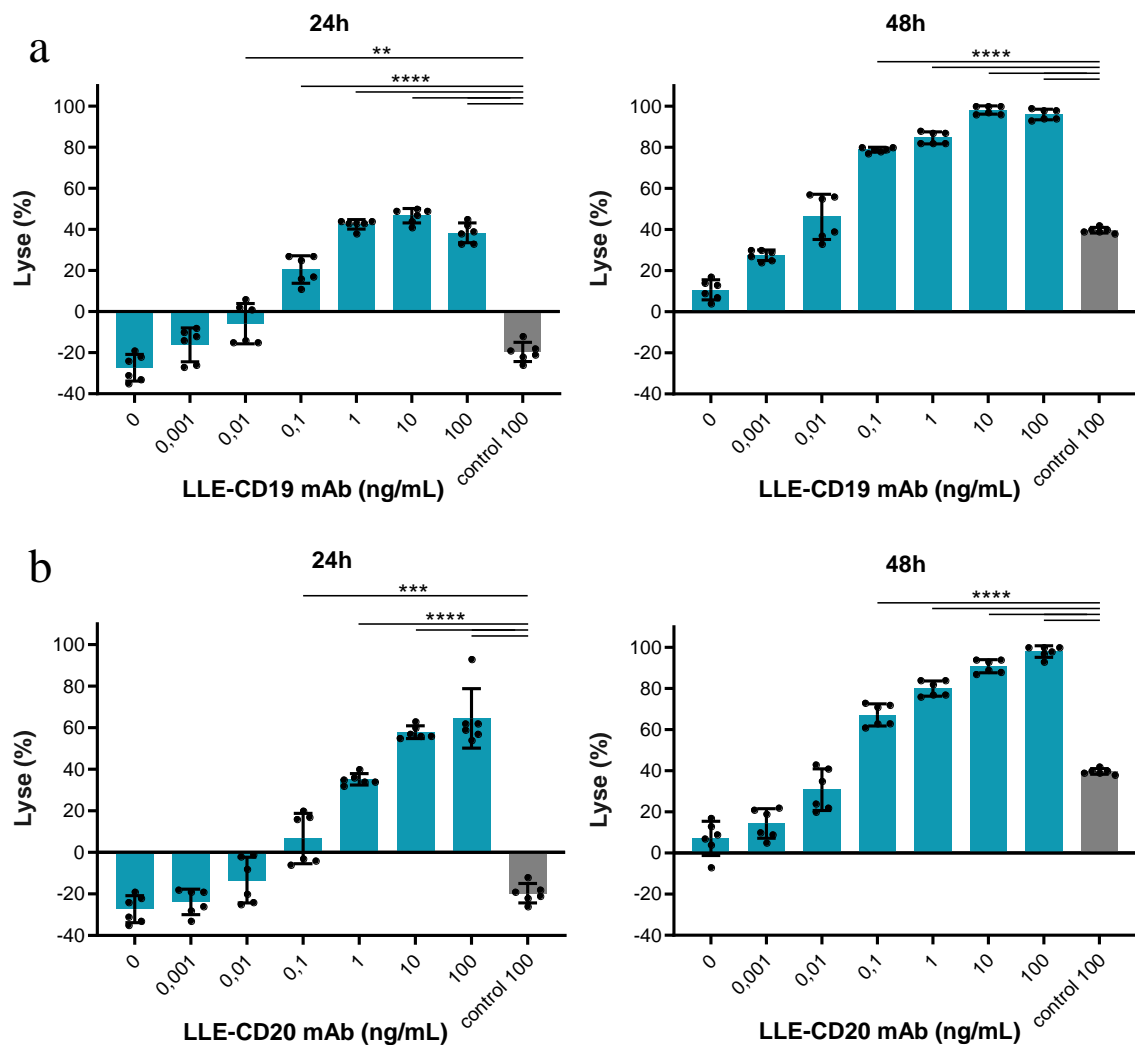
Nach 24 Stunden führte LLE-CD79b mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (14 %

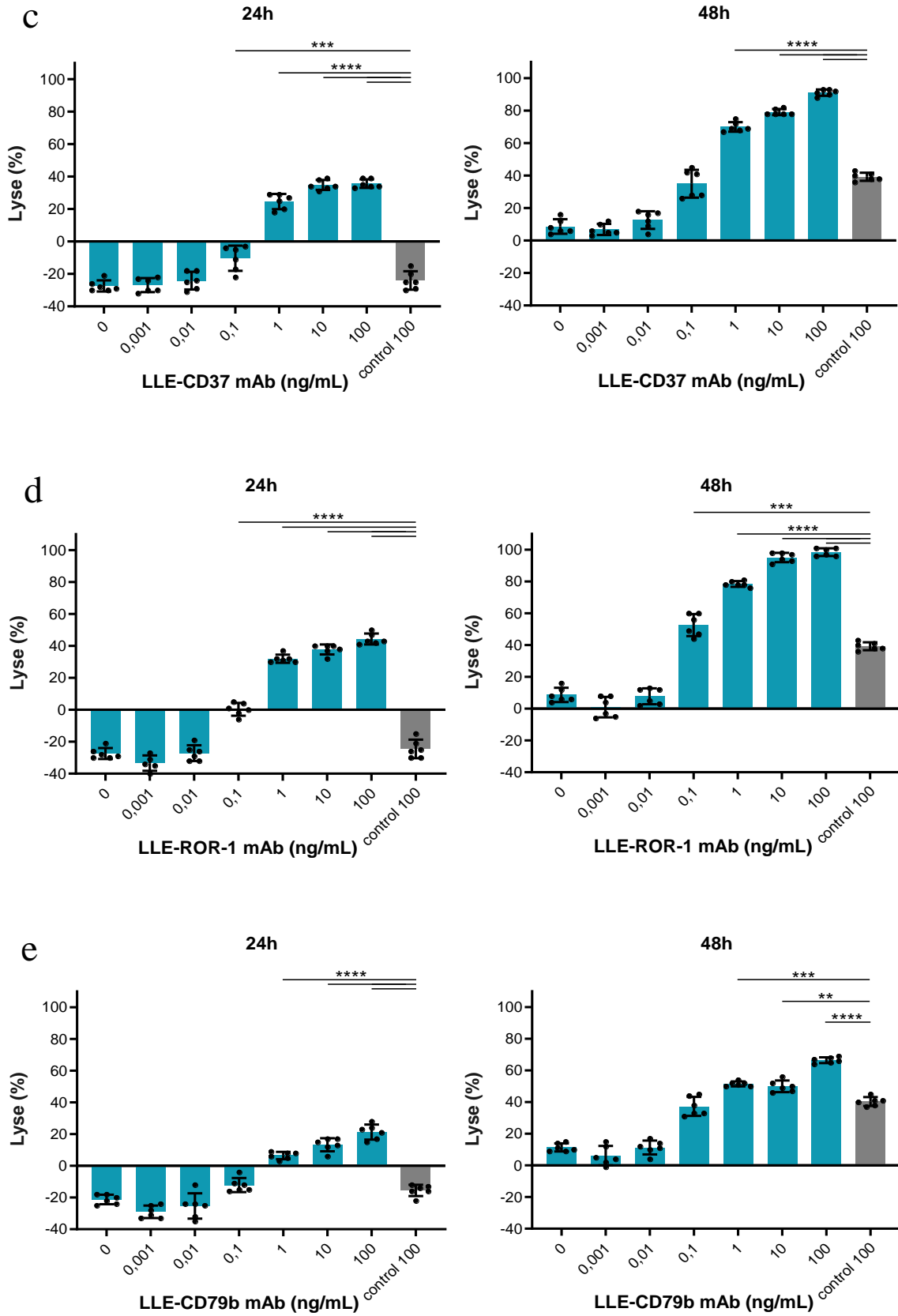
vs. -21 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD79b mAb durchschnittlich 37 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (56 % vs. 37 %).

LLE-CD22 mAb vermittelte nach 24 Stunden lediglich eine sehr geringe Lyse der Target-Zellen (durchschnittlich ≤ 8 %). Nach 48 Stunden führte LLE-CD22 mAb mit einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (51 % vs. 37 %).

Unterhalb der Schwellenkonzentrationen der LLE-mAb war die spezifische Tumorlyse sehr gering, entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper oder es war sogar eine Proliferation der Tumorzellen zu beobachten.

Um die Schwellenkonzentration genauer definieren zu können, wurden alle LLE-mAb im nächsten Schritt in kleineren Konzentrationsunterschieden bis maximal 10 ng/mL titriert.





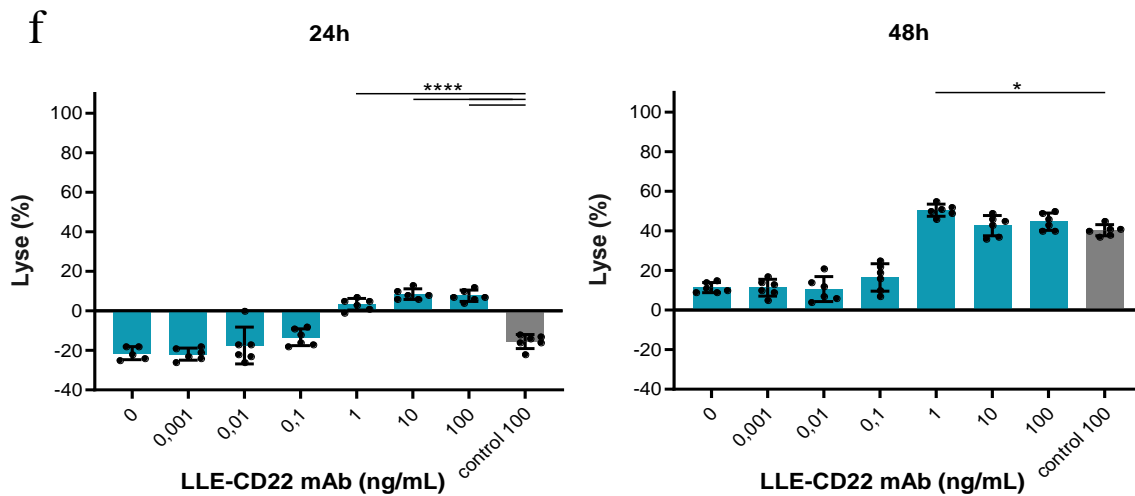


Abbildung 3.11: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** (a), **LLE-CD20 mAb** (b), **LLE-CD37 mAb** (c), **LLE-ROR-1 mAb** (d), **LLE-79b mAb** (e) und **LLE-CD22 mAb** (f) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.2.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

Um die genaue Schwellenkonzentration zu ermitteln, wurden die Abstände zwischen den untersuchten Konzentrationen der Adaptermoleküle weiter verringert (siehe Abbildung 3.12). Die AM wurden im Bereich von 10 bis 1000 pg/mL bzw. im Fall von LLE-CD20 mAb, LLE-CD79b mAb und LLE-CD22 mAb bis 10 000 pg/mL titriert. Nach 48 Stunden konnte bei LLE-CD19 mAb, LLE-CD20 mAb und LLE-ROR-1 mAb über den gesamten Titrationsbereich eine zunehmende Lyse der Target-Zellen verzeichnet werden. Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 1000 pg/mL bzw. 10 000 pg/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD19 mAb bereits ab einer Konzentration von 50 pg/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (17 % vs. -25 %). Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 21 % bei einer Konzentration von 25 pg/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 50 pg/mL 62 % der Target-Zellen lysiert wurden.

Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 28 %, wodurch die Lyse durch LLE-CD19 mAb ab einer Konzentration von 50 pg/mL signifikant höher (62 %) war als die Kontrolle.

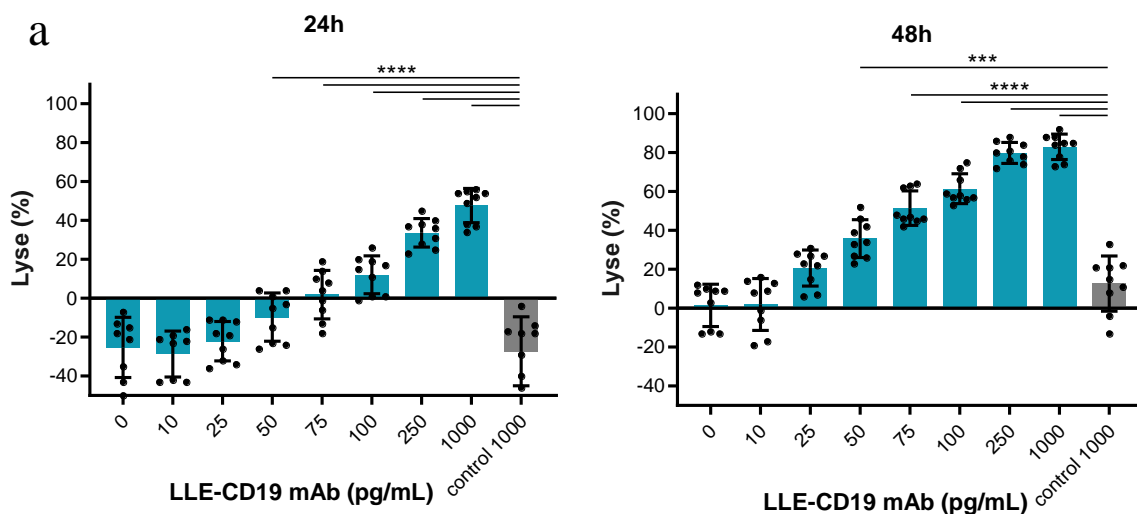
LLE-CD20 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 1000 pg/mL nach 24 Stunden (26 % vs. -6 %) und nach 48 Stunden (71 % vs. 40 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD37 mAb mit einer Konzentration von 10 000 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (22 % vs. -25 %).

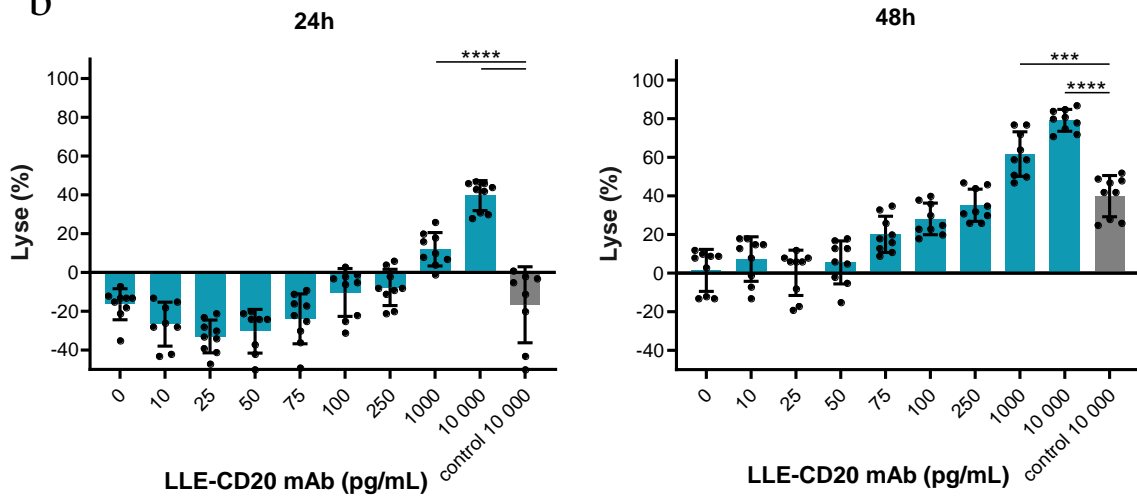
Nach 24 Stunden führte LLE-ROR-1 mAb ab einer Konzentration von 100 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (22 % vs. -25 %). Nach 48 Stunden war die Tumorlyse durch LLE-ROR-1 mAb ab einer Konzentration von 250 pg/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (73 % vs. 28 %).

LLE-CD79b mAb und LLE-CD22 mAb vermittelten lediglich eine sehr geringe oder nicht signifikante Lyse der Target-Zellen.

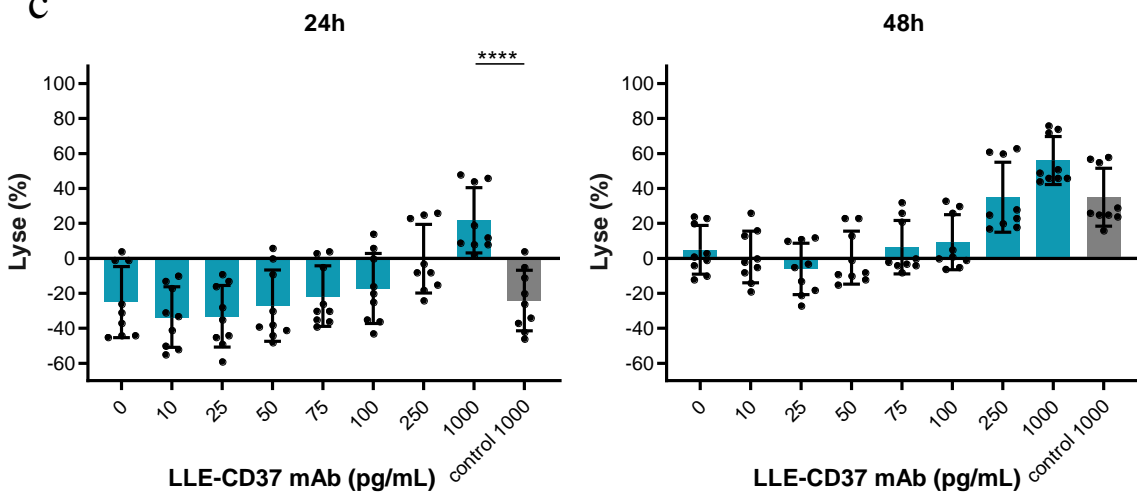
Für die LLE-mAb-Kombination wurden von LLE-CD19 mAb, LLE-CD20 mAb, LLE-CD37 mAb und LLE-ROR-1 mAb subtherapeutische Konzentrationen ausgewählt, die allein zu keiner signifikant höheren spezifischen Lyse im Vergleich zum Kontrollantikörper führten.



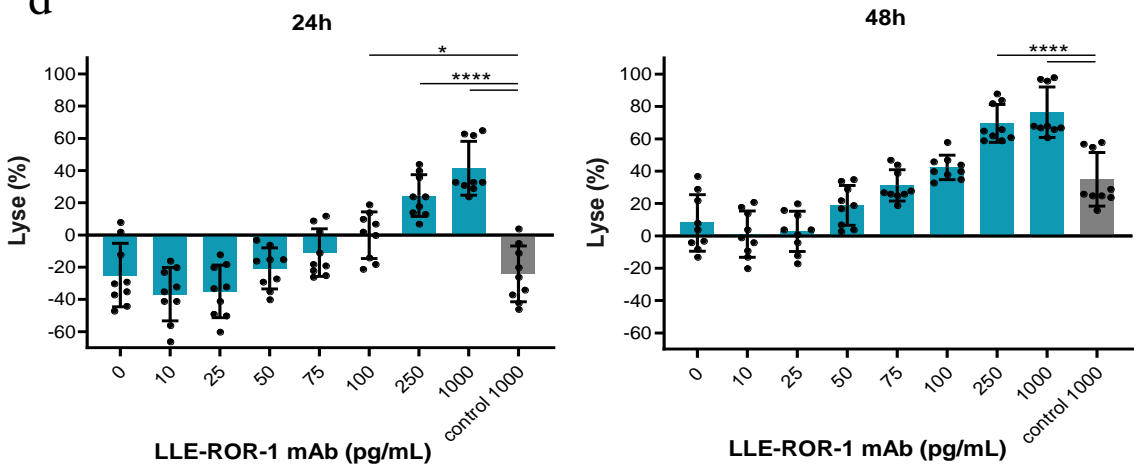
b



c



d



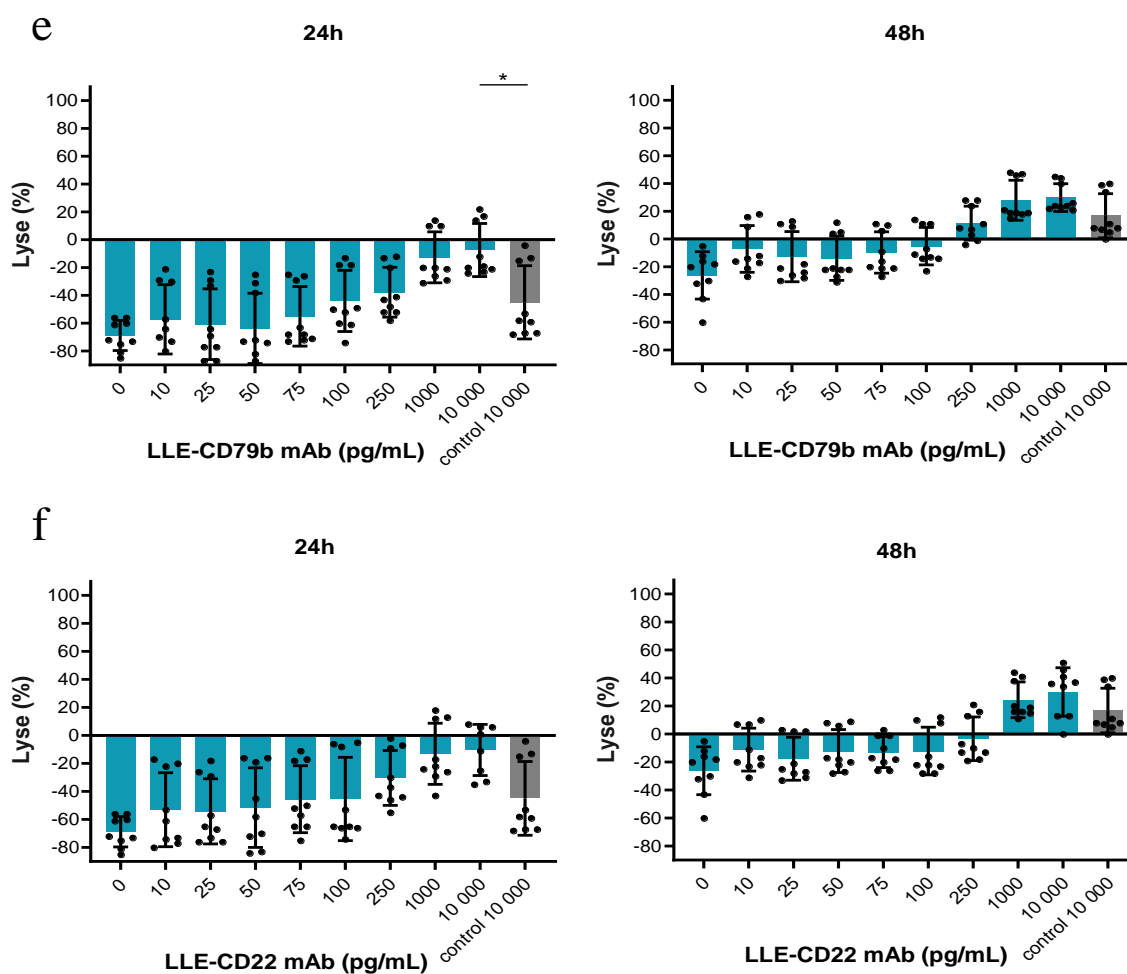


Abbildung 3.12: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** (a), **LLE-CD20 mAb** (b), **LLE-CD37 mAb** (c), **LLE-ROR-1 mAb** (d), **LLE-CD79b mAb** (e) und **LLE-CD22 mAb** (f) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.2.4 Multiples Targeting

LLE-CD19 mAb, LLE-CD20 mAb und LLE-CD37 mAb wurden jeweils mit der Konzentration 50 pg/mL und LLE-ROR-1 mAb mit der Konzentration 75 pg/mL in der LLE-mAb-Kombination eingesetzt (siehe Abbildung 3.13). Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 225 pg/mL und ohne LLE-mAb verglichen.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD19 mAb mit einer Konzentration von 50 pg/mL zu 15 % Lyse, LLE-CD20 mAb mit 50 pg/mL zu 6 % Lyse, LLE-CD37 mAb mit 50 pg/mL zur Proliferation (-6 % Lyse) und LLE-ROR-1 mAb mit 75 pg/mL zur Proliferation (-8 % Lyse) der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 225 pg/mL zur Proliferation (-18 % Lyse).

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 24 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 6 %.

Nach 48 Stunden führte LLE-CD19 mAb mit einer Konzentration von 50 pg/mL zu 33 % Lyse, LLE-CD20 mAb mit 50 pg/mL zu 17 % Lyse, LLE-CD37 mAb mit 50 pg/mL zur Proliferation (-3 % Lyse) und LLE-ROR-1 mAb mit 75 pg/mL zur Proliferation (-17 % Lyse) der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 225 pg/mL zu durchschnittlich 35 % Lyse.

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 48 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 67 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

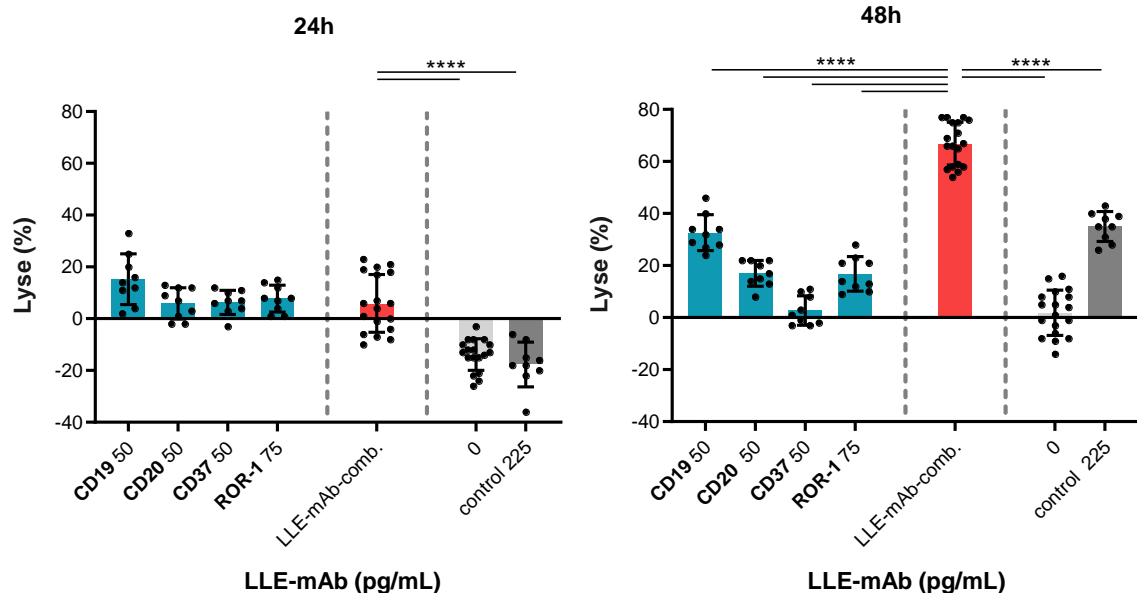


Abbildung 3.13: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 wt Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb**, **LLE-CD20 mAb**, **LLE-CD37 mAb** und **LLE-ROR-1 mAb** einzeln (türkis) und in Kombination (rot) eingesetzt; Vergleich zu einem Kontrollantikörper (dunkelgrau) und einer Mediumkontrolle (hellgrau); E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten bzw. sechs technischen Replikaten bei den Konditionen „LLE-mAb-comb.“ und „0“; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.3 LS (Neuroblastom)

3.4.3.1 E:T-Titration

In diesem Experiment wurde das Verhältnis von Effektor- zu Target-Zellen unter jeweils drei verschiedenen Bedingungen untersucht (siehe Abbildung 3.14).

Die E:T-Titration erfolgte zusammen mit LLE-CD276 mAb, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper (LLE-mAb-Kontrolle) und ohne LLE-mAb.

Mit LLE-CD276 mAb als AM war bei allen E:T-Ratios nach 24 und 48 Stunden eine Lyse der Target-Zellen zu beobachten. Die induzierte Lyse war außer bei der E:T-Ratio von 10:1 nach 48 Stunden bei allen Konditionen signifikant höher als bei den Kontrollen. Nach 24 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T-Ratios von 1:1, 2:1 und 2,5:1 mit LLE-CD276 mAb 93 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 33 % und ohne LLE-mAb 1 %. Nach 48 Stunden betrug die durchschnittliche Lyse mit den E:T Ratios von 0,5:1 und 1:1 mit LLE-CD276 mAb 97 %, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper 48 % und ohne LLE-mAb 10 %.

Es wurde eine E:T-Ratio von 1:1 für alle weiteren Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie LS festgelegt. Mit diesem Verhältnis betrug die durchschnittliche Tumorlyse nach 24 Stunden Inkubationszeit mit LLE-CD276 mAb 83 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (15 %) und ohne LLE-mAb (0 %). Nach 48 Stunden Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Tumorlyse mit LLE-276 mAb 100 % und war damit signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (60 %) und ohne LLE-mAb (11 %).

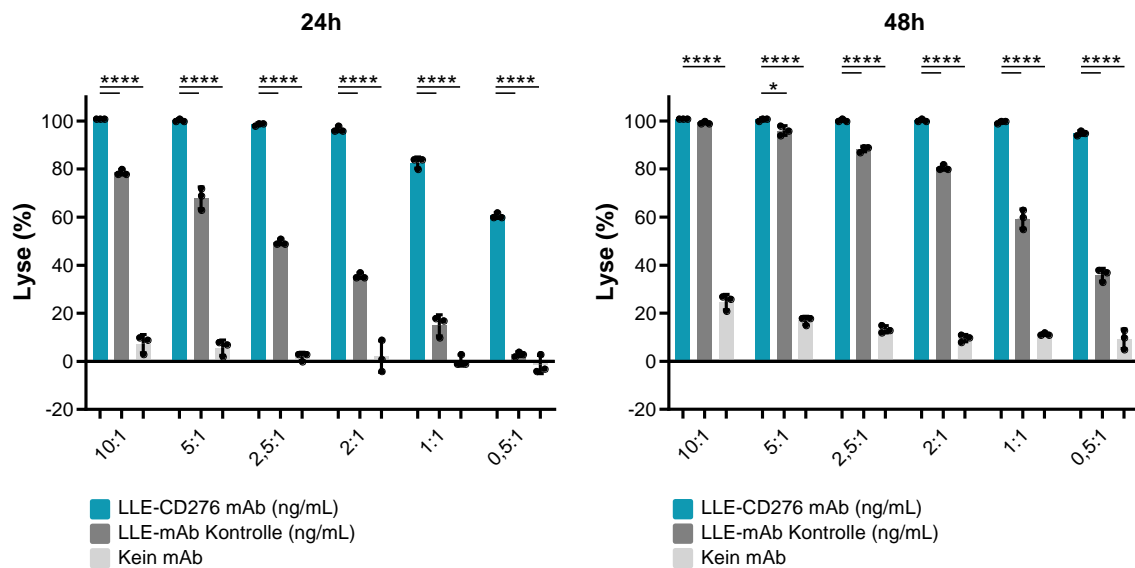


Abbildung 3.14: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - E:T-Titration

Die E:T-Titration (AdCAR-T-Zellen:LS Zellen) wurde mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper LLE-CD276 mAb 10 ng/mL (türkis), mit einem Kontrollantikörper 10 ng/mL (dunkelgrau) und ohne Adaptermolekül (hellgrau) in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=1 mit drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.3.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

Entsprechend der ermittelten Antigenexpression (siehe Kapitel 3.2.3) wurden bei der Tumorzelllinie LS LLE-CD276 mAb, LLE-CD117 mAb, LLE-CD171 mAb, LLE-81 mAb und LLE-GD2 mAb in verschiedenen LCA eingesetzt (siehe Abbildung 3.15). Die AM wurden im Bereich von 0,001 bis 100 ng/mL titriert. Die spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 100 ng/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD276 mAb bereits ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (73 % vs. 3 %). Die Schwellenwertkonzentration von 0,1 ng/mL war nach 48 Stunden klar ersichtlich. Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 14 % bei einer Konzentration von 0,01 ng/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL 90 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 46 %, wodurch die Lyse durch LLE-CD276 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher (90 %) war als die Kontrolle.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD117 mAb ab einer Konzentration von 0,01 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (44 % vs. 3 %). Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD117 mAb durchschnittlich 32 % bei einer Konzentration von 0,01 ng/mL und war ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (83 % vs. 46 %).

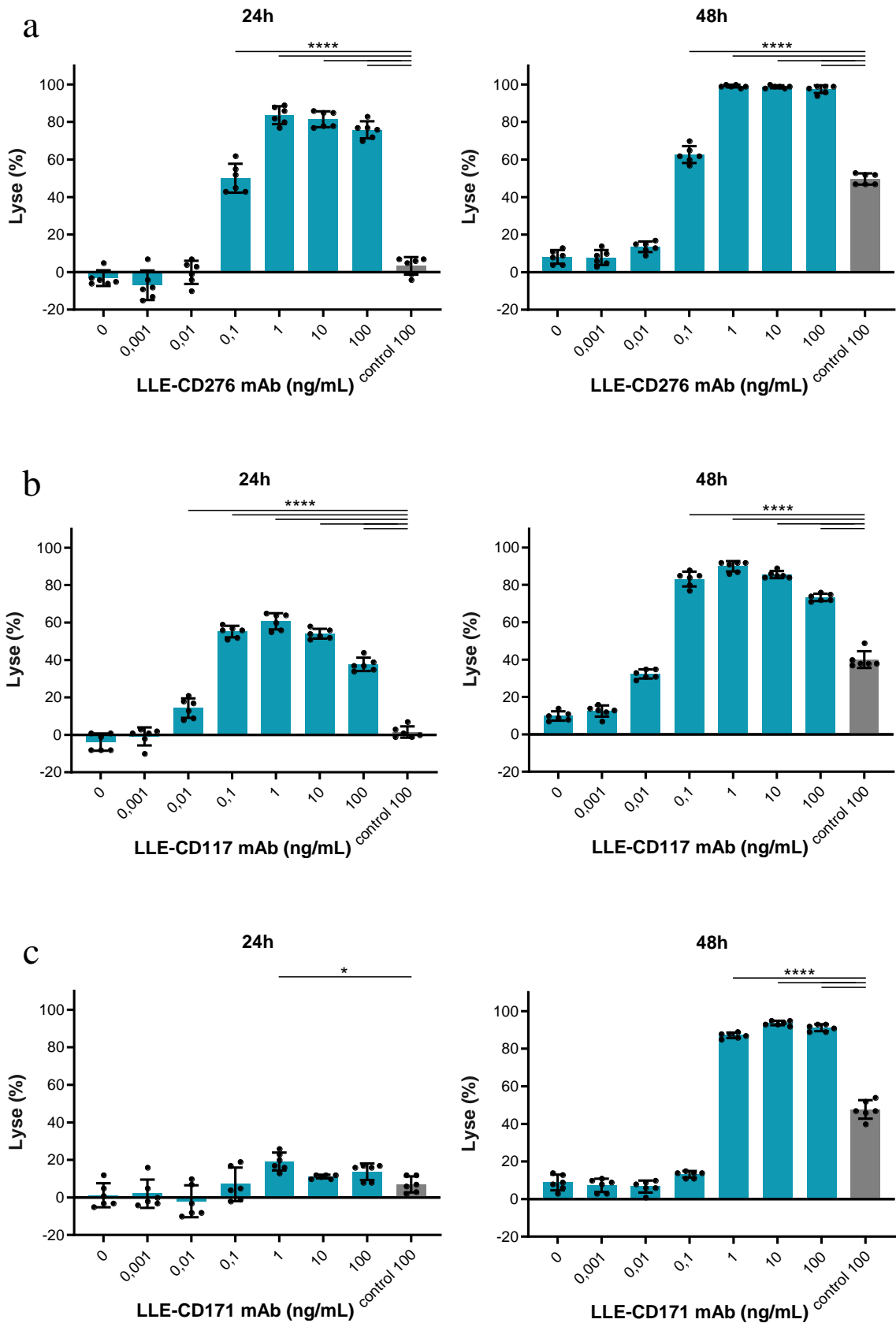
Nach 24 Stunden führte LLE-CD171 mAb mit einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (19 % vs. 3 %). Die Schwellenwertkonzentration von 1 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD171 mAb 13 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (91 % vs. 46 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-CD81 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (45 % vs. 3 %). Die Schwellenwertkonzentration von 0,1 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD81 mAb 15 % bei einer Konzentration von 0,01 ng/mL und war ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (72 % vs. 46 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-GD2 mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (40 % vs. 3 %). Die Schwellenwertkonzentration von 1 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-GD2 mAb durchschnittlich 18 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (84 % vs. 46 %).

Unterhalb der Schwellenkonzentration der LLE-mAb war die spezifische Tumorlyse sehr gering, entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper oder es war sogar eine Proliferation der Tumorzellen zu beobachten.

Um die Schwellenkonzentration genauer definieren zu können, wurden alle LLE-mAb im nächsten Schritt in kleineren Konzentrationsunterschieden bis maximal 10 ng/mL titriert.



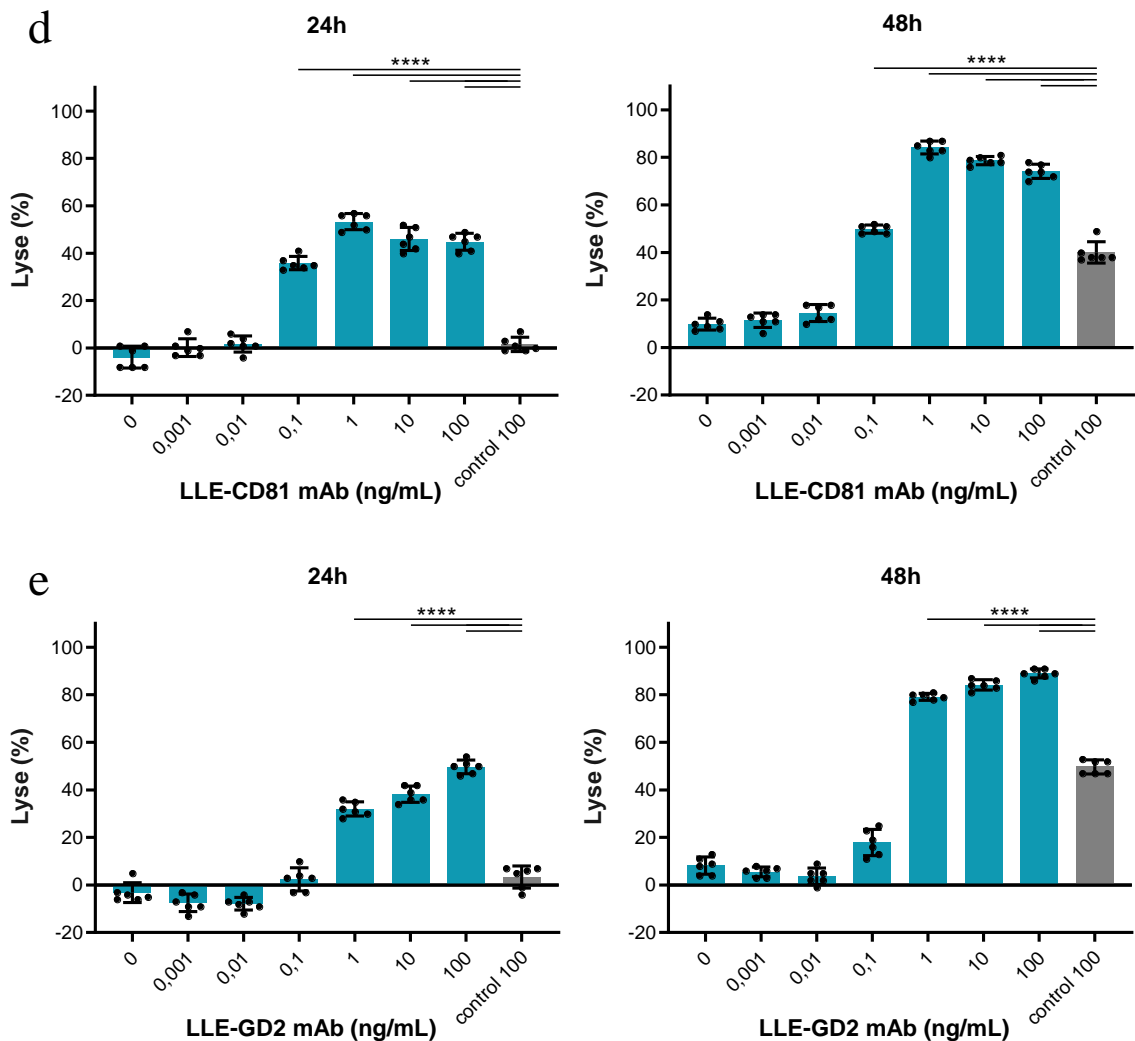


Abbildung 3.15: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD276 mAb** (a), **LLE-CD117 mAb** (b), **LLE-CD171 mAb** (c), **LLE-CD81 mAb** (d) und **LLE-GD2 mAb** (e) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=1:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.3.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

Um die genaue Schwellenkonzentration zu ermitteln, wurden die Abstände zwischen den untersuchten Konzentrationen der Adaptermoleküle weiter verringert (siehe Abbildung 3.16). Die AM wurden im Bereich von 10 bis 1000 pg/mL bzw. im Fall von LLE-CD117 mAb und LLE-CD81 mAb bis 10 000 pg/mL titriert.

Nach 48 Stunden konnte bei allen LLE-mAb über den gesamten Titrationsbereich eine zunehmende Lyse der Target-Zellen verzeichnet werden. Die induzierte spezifische

Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 1000 pg/mL bzw. 10 000 pg/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-CD276 mAb bereits ab einer Konzentration von 50 pg/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (45 % vs. -1 %). Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 18 % bei einer Konzentration von 10 pg/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 75 pg/mL 76 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 36 %, wodurch die Lyse durch LLE-CD276 mAb ab einer Konzentration von 75 pg/mL signifikant höher (76 %) war als die Kontrolle.

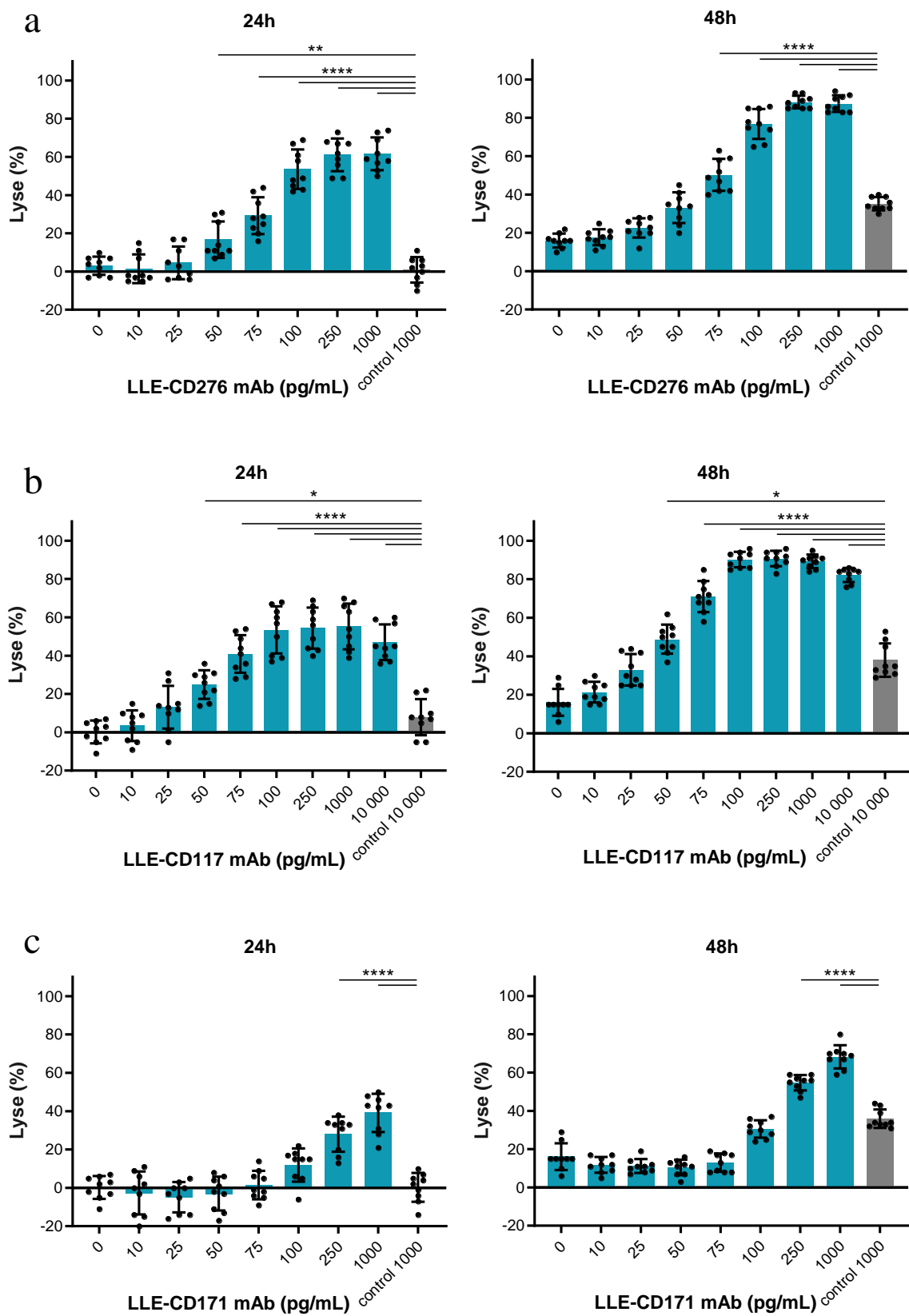
LLE-CD117 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 50 pg/mL nach 24 Stunden (46 % vs. 9 %) und nach 48 Stunden (79 % vs. 37 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

LLE-CD171 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 250 pg/mL nach 24 Stunden (34 % vs. -1 %) und nach 48 Stunden (62 % vs. 36 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

LLE-CD81 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper ab einer Konzentration von 75 pg/mL nach 24 Stunden (41 % vs. 9 %) und nach 48 Stunden (71 % vs. 37 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

Nach 24 Stunden führte LLE-GD2 mAb ab einer Konzentration von 100 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (21 % vs. -1 %). Nach 48 Stunden war die Tumorlyse durch LLE-GD2 mAb ab einer Konzentration von 250 pg/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (54 % vs. 36 %).

Für die LLE-mAb-Kombination wurden von den einzelnen LLE-mAb subtherapeutische Konzentrationen ausgewählt, die allein zu keiner signifikant höheren spezifischen Lyse im Vergleich zum Kontrollantikörper führten.



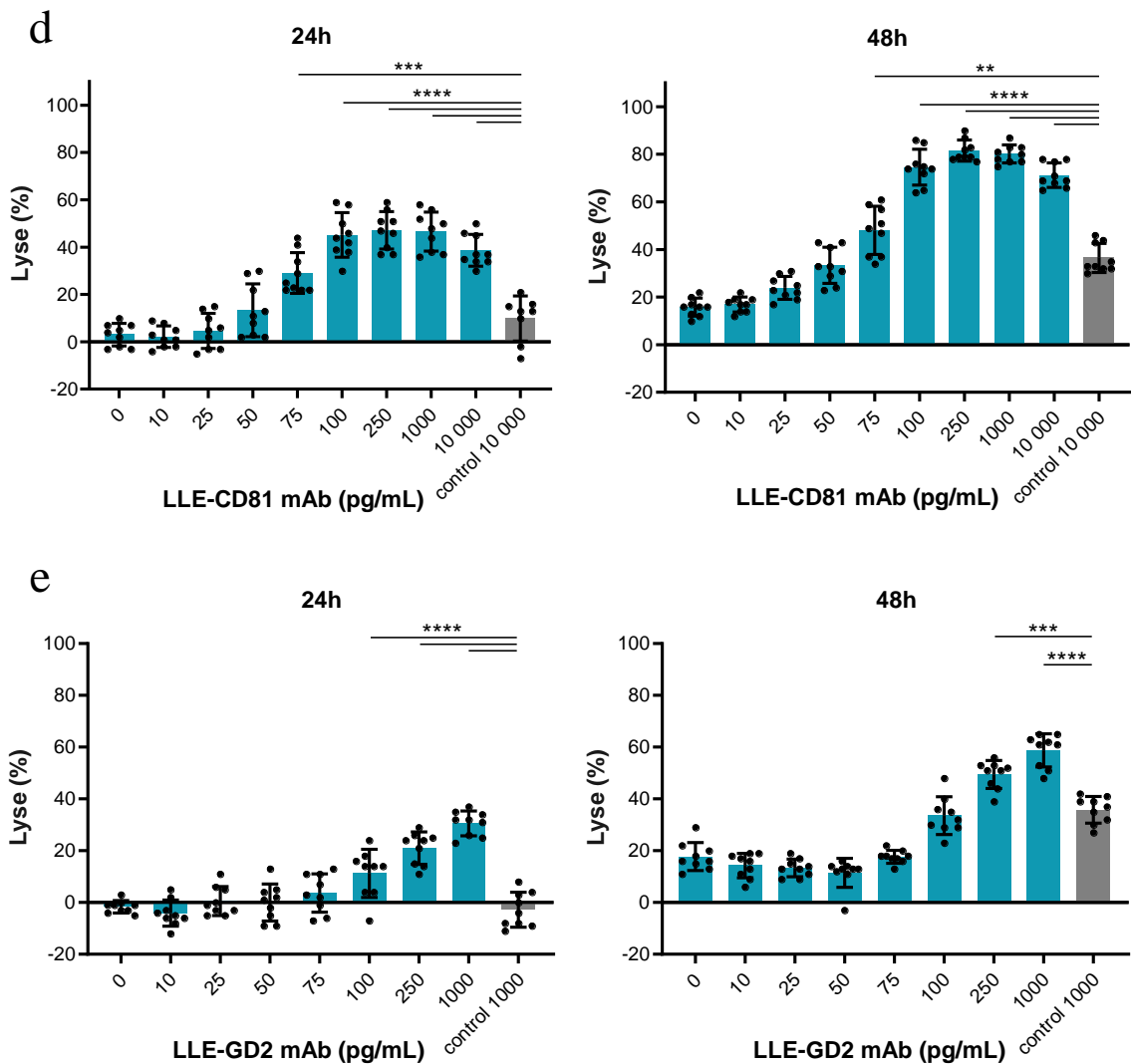


Abbildung 3.16: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD276 mAb** (a), **LLE-CD117 mAb** (b), **LLE-CD171 mAb** (c), **LLE-CD81 mAb** (d) und **LLE-GD2 mAb** (e) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=1:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.3.4 Multiples Targeting

LLE-CD276 mAb, LLE-CD117 mAb, LLE-CD171 mAb, LLE-81 mAb und LLE-GD2 mAb wurden jeweils mit der Konzentration 50 pg/mL in der LLE-mAb-Kombination eingesetzt (siehe Abbildung 3.17). Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 250 pg/mL und ohne LLE-mAb verglichen.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD276 mAb mit einer Konzentration von 50 pg/mL zu 18 % Lyse, LLE-CD117 mAb mit 50 pg/mL zu 27 % Lyse, LLE-CD81 mAb mit 50 pg/mL zu 9 % Lyse, LLE-CD171 mAb mit 50 pg/mL zur Proliferation (-15 % Lyse) und LLE-GD2 mAb mit 50 pg/mL zu 5 % Lyse der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 250 pg/mL zur Proliferation (-5 % Lyse).

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 24 Stunden zu einer Tumorlyse von 51 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

Nach 48 Stunden führte LLE-CD276 mAb mit einer Konzentration von 50 pg/mL zu 29 % Lyse, LLE-CD117 mAb mit 50 pg/mL zu 44 % Lyse, LLE-CD81 mAb mit 50 pg/mL zu 21 % Lyse, LLE-CD171 mAb mit 50 pg/mL zu 8 % Lyse und LLE-GD2 mAb mit 50 pg/mL zu 3 % Lyse der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 250 pg/mL zu durchschnittlich 9 % Lyse.

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 48 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 67 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

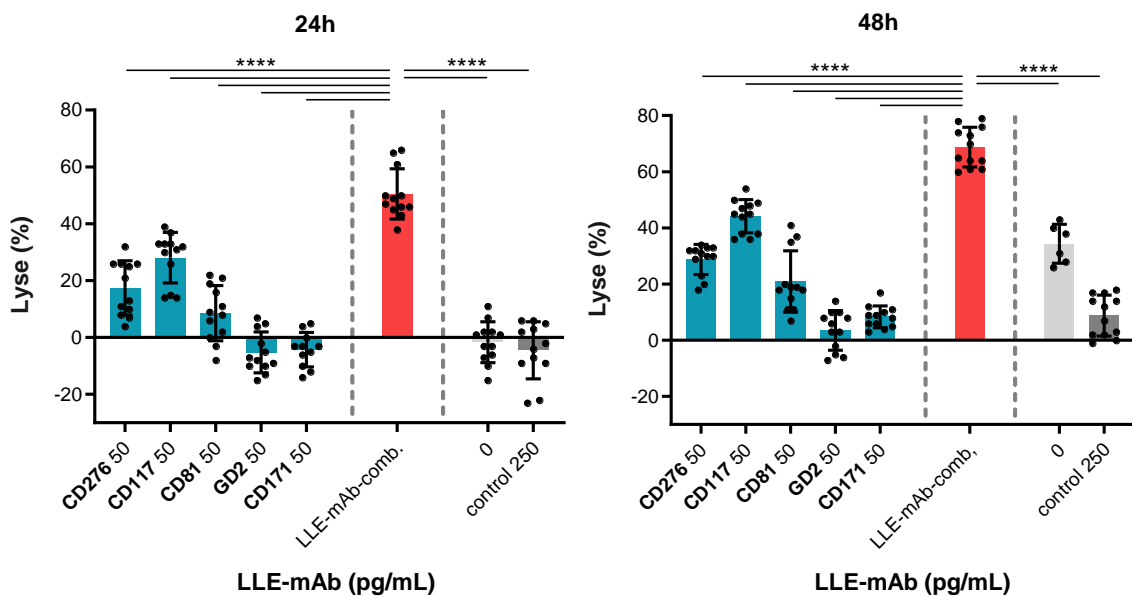


Abbildung 3.17: AdCAR-T-Zellen vs. LS Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD276 mAb**, **LLE-CD117 mAb**, **LLE-CD81 mAb**, **LLE-GD2 mAb** und **LLE-CD171 mAb** einzeln (türkis) und in Kombination (rot) eingesetzt; Vergleich zu einem Kontrollantikörper (dunkelgrau) und einer Mediumkontrolle (hellgrau); E:T-Ratio=1:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=4 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten bzw. sechs technischen Replikaten bei den Konditionen „LLE-mAb-comb.“ und „0“; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.4 HS-578T (Mammakarzinom)

3.4.4.1 E:T-Titration

In diesem Experiment wurde das Verhältnis der Effektor- zu Target-Zellen unter jeweils drei verschiedenen Bedingungen untersucht (siehe Abbildung 3.18).

Die E:T-Titration erfolgte zusammen mit LLE-EGFR mAb, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper (LLE-mAb-Kontrolle) und ohne LLE-mAb.

LLE-EGFR mAb führte nach 24 Stunden bei den E:T-Ratios von 2:1, 2,5:1, 5:1 und 10:1 und nach 48 Stunden bei allen E:T-Ratios zu einer Lyse der Target-Zellen. Nach 48 Stunden war die induzierte Lyse durch den Kontrollantikörper sehr hoch (> 28 %).

Es wurde eine E:T-Ratio von 5:1 für alle weiteren Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie HS-578T festgelegt. Mit diesem Verhältnis betrug die durchschnittliche Tumorlyse nach 24 Stunden Inkubationszeit mit LLE-EGFR mAb 97 % und mit biotinyliertem Kontrollantikörper (-2 % Lyse) und ohne LLE-mAb kam es zur Proliferation (-16 % Lyse). Die induzierte Lyse durch LLE-EGFR mAb war damit signifikant höher als die unspezifische Lyse durch die Kontrollen. Nach 48 Stunden Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Tumorlyse mit LLE-EGFR mAb 100 % und war signifikant höher als mit biotinyliertem Kontrollantikörper (86 %) und ohne LLE-mAb (15 %).

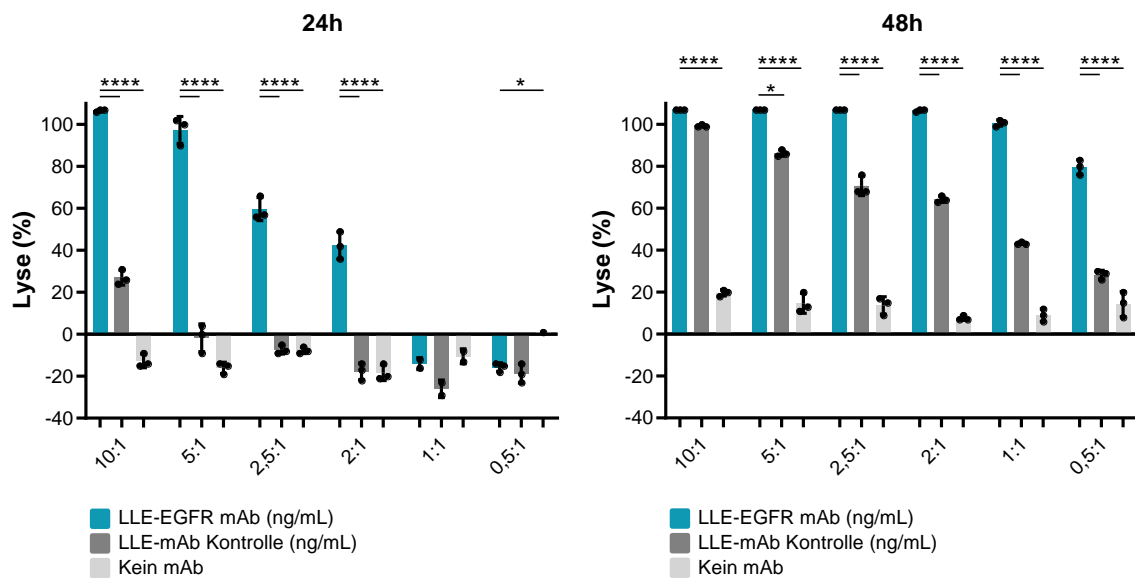


Abbildung 3.18: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - E:T-Titration

Die E:T-Titration (AdCAR-T-Zellen:HS-578T Zellen) wurde mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper LLE-EGFR mAb 10 ng/mL (türkis), mit einem Kontrollantikörper 10 ng/mL (dunkelgrau) und ohne Adaptermolekül (hellgrau) in einem Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=1 mit drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.4.2 LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

Entsprechend der ermittelten Antigenexpression (siehe Kapitel 3.2.4) wurden bei der Tumorzelllinie HS-578T LLE-EGFR mAb, LLE-CD47 mAb, LLE-CD276 mAb und LLE-ROR-1 mAb in verschiedenen LCA eingesetzt (siehe Abbildung 3.19). Die AM wurden im Bereich von 0,001 bis 100 ng/mL titriert. Bei allen LLE-mAb wurde die Schwellenwertkonzentration nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Die spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 100 ng/mL verglichen.

Nach 24 Stunden vermittelte LLE-EGFR mAb bereits ab einer Konzentration von 1 ng/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (90 % vs. -15 %). Die Schwellenwertkonzentration von 1 ng/mL war nach 48 Stunden klar ersichtlich. Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 29 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 1 ng/mL 100 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 77 %, wodurch die Lyse durch LLE-EGFR mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher (100 %) war als die Kontrolle.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD47 mAb ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (49 % vs. -15 %). Die Schwellenwertkonzentration von 1 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD47 mAb durchschnittlich 16 % bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 1 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (100 % vs. 77 %).

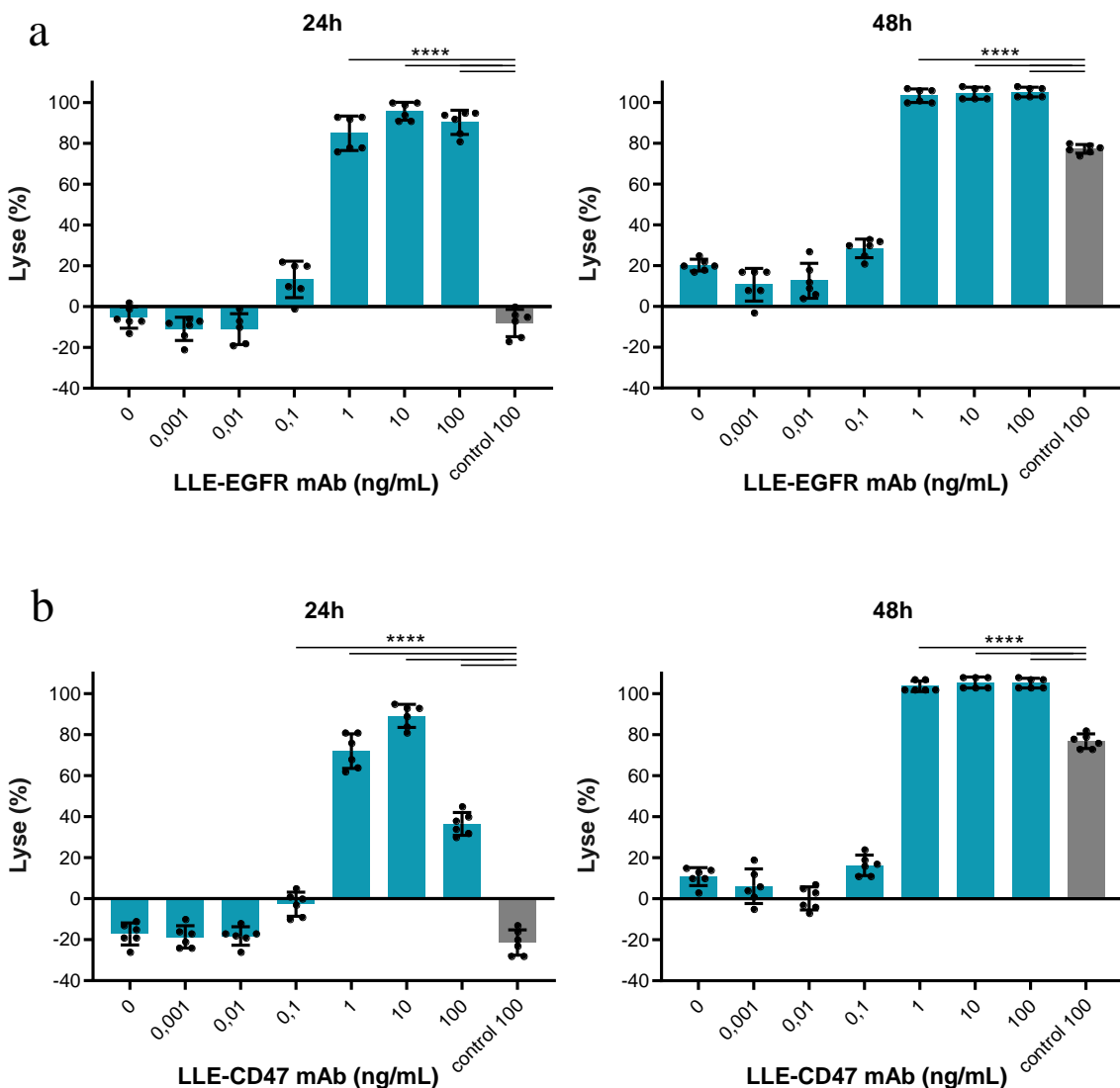
Nach 24 Stunden führte LLE-CD276 mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (63 % vs. -15 %). Die Schwellenwertkonzentration von 10 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-CD276 mAb durchschnittlich 53 % bei einer Konzentration von 1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 10 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (100 % vs. 77 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-ROR-1 mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (47 % vs. -15 %). Die Schwellenwertkonzentration von 10 ng/mL war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach 48 Stunden betrug die Lyse durch LLE-ROR-1 mAb durchschnittlich

48 % bei einer Konzentration von 1 ng/mL und war ab einer Konzentration von 10 ng/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (92 % vs. 77 %).

Unterhalb der Schwellenkonzentrationen der LLE-mAb war die spezifische Tumorlyse sehr gering, entsprach der unspezifischen Tumorlyse durch den Kontrollantikörper oder es war sogar eine Proliferation der Tumorzellen zu beobachten.

Um die Schwellenkonzentration genauer definieren zu können, wurden alle LLE-mAb im nächsten Schritt in kleineren Konzentrationsunterschieden bis maximal 10 ng/mL titriert.



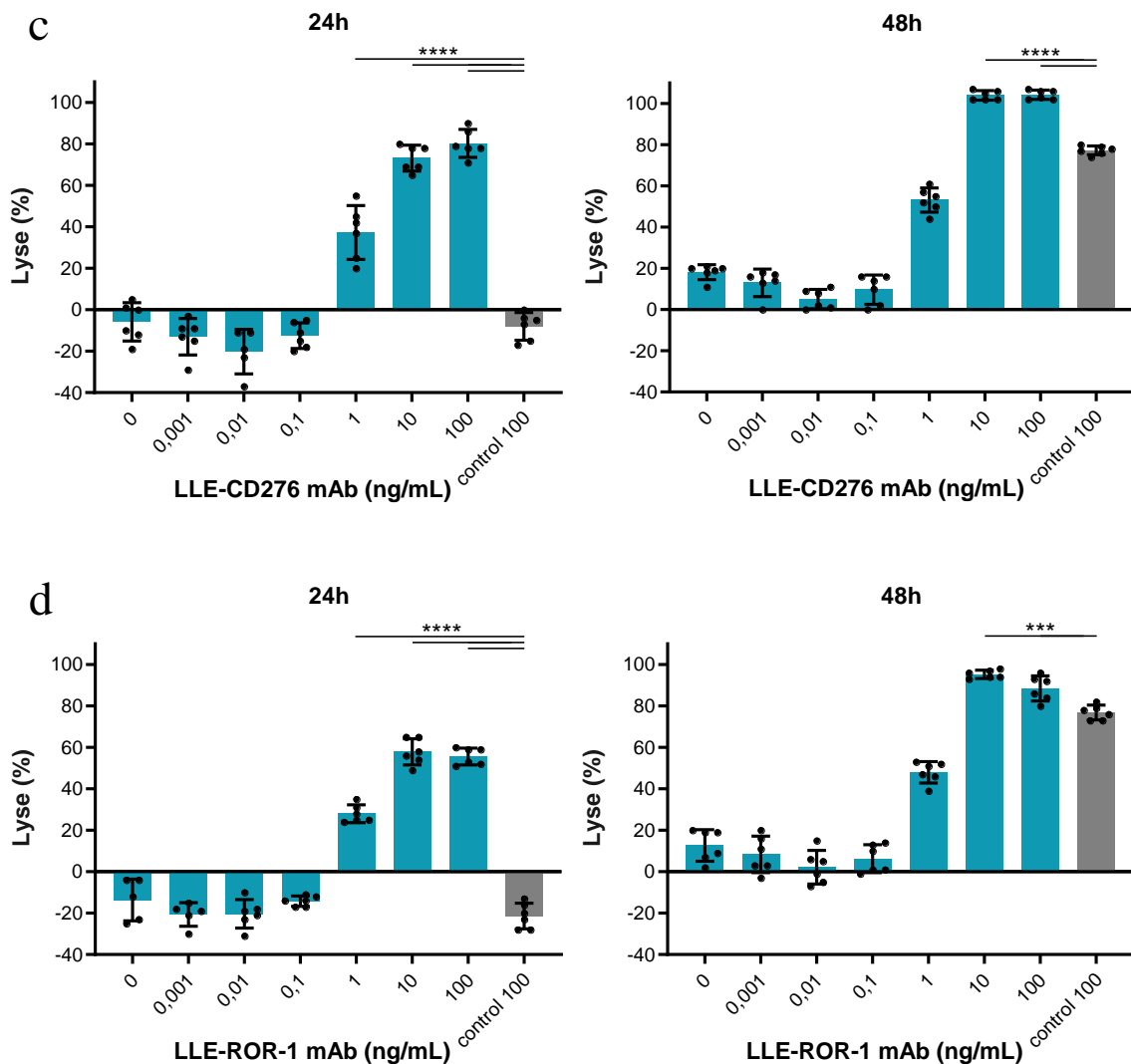


Abbildung 3.19: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-EGFR mAb** (a), **LLE-CD47 mAb** (b), **LLE-CD276 mAb** (c) und **LLE-ROR-1 mAb** (d) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=5:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.4.3 LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

Um die genaue Schwellenkonzentration zu ermitteln, wurden die Abstände zwischen den untersuchten Konzentrationen der Adaptermoleküle weiter verringert (siehe Abbildung 3.20). Die AM wurden im Bereich von 10 bis 1000 pg/mL bzw. im Fall von LLE-CD47 mAb und LLE-CD276 mAb bis 10 000 pg/mL titriert. Die induzierte spezifische Tumolyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 1000 pg/mL bzw. 10 000 pg/mL verglichen.

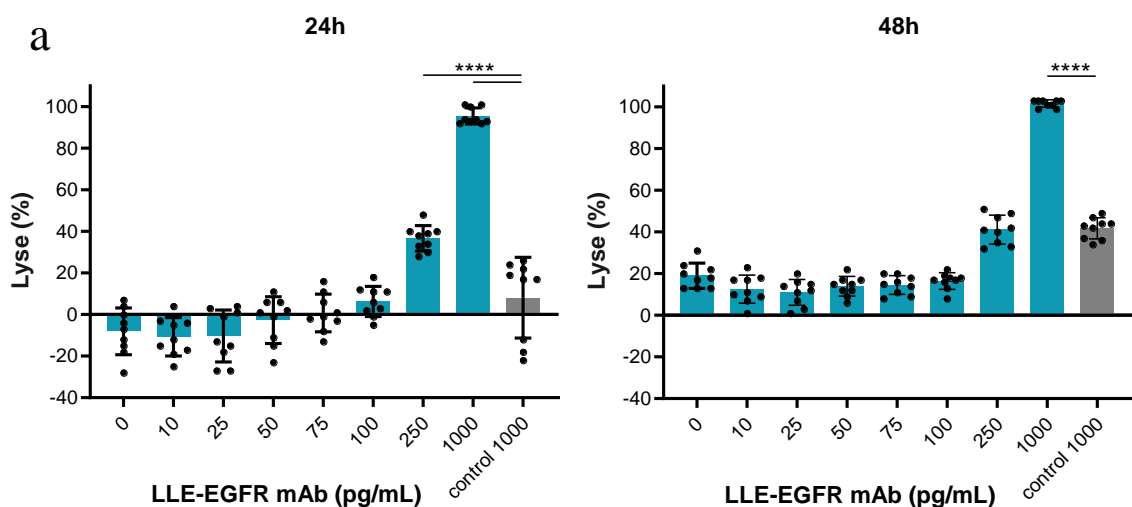
Nach 24 Stunden vermittelte LLE-EGFR mAb ab einer Konzentration von 250 pg/mL eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (67 % vs. 12 %). Die Lyse betrug nach 48 Stunden durchschnittlich 41 % bei einer Konzentration von 250 pg/mL, wohingegen ab einer Konzentration von 1000 pg/mL 100 % der Target-Zellen lysiert wurden. Die durch den Kontrollantikörper vermittelte Lyse betrug nach 48 Stunden 44 %, wodurch die Lyse durch LLE-EGFR mAb ab einer Konzentration von 1000 pg/mL signifikant höher (100 %) war als die Kontrolle.

Nach 24 Stunden führte LLE-CD47 mAb ab einer Konzentration von 250 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (70 % vs. 7 %). Nach 48 Stunden war die Tumorlyse durch LLE-CD47 mAb ab einer Konzentration von 1000 pg/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (100 % vs. 79 %).

Nach 24 Stunden führte LLE-CD276 mAb ab einer Konzentration von 1000 pg/mL zu einer signifikant höheren Lyse im Vergleich zum biotinylierten Kontrollantikörper (82 % vs. 7 %). Nach 48 Stunden war die Tumorlyse durch LLE-CD276 mAb erst bei einer Konzentration von 10 000 pg/mL signifikant höher als durch den Kontrollantikörper (100 % vs. 79 %).

LLE-ROR-1 mAb führte im Vergleich zum Kontrollantikörper erst mit einer Konzentration von 1000 pg/mL nach 24 Stunden (57 % vs. 12 %) und nach 48 Stunden (64 % vs. 44 %) zu einer signifikant höheren Lyse.

Für die LLE-mAb-Kombination wurden von den einzelnen LLE-mAb subtherapeutische Konzentrationen ausgewählt, die allein zu keiner signifikant höheren spezifischen Lyse im Vergleich zum Kontrollantikörper führten.



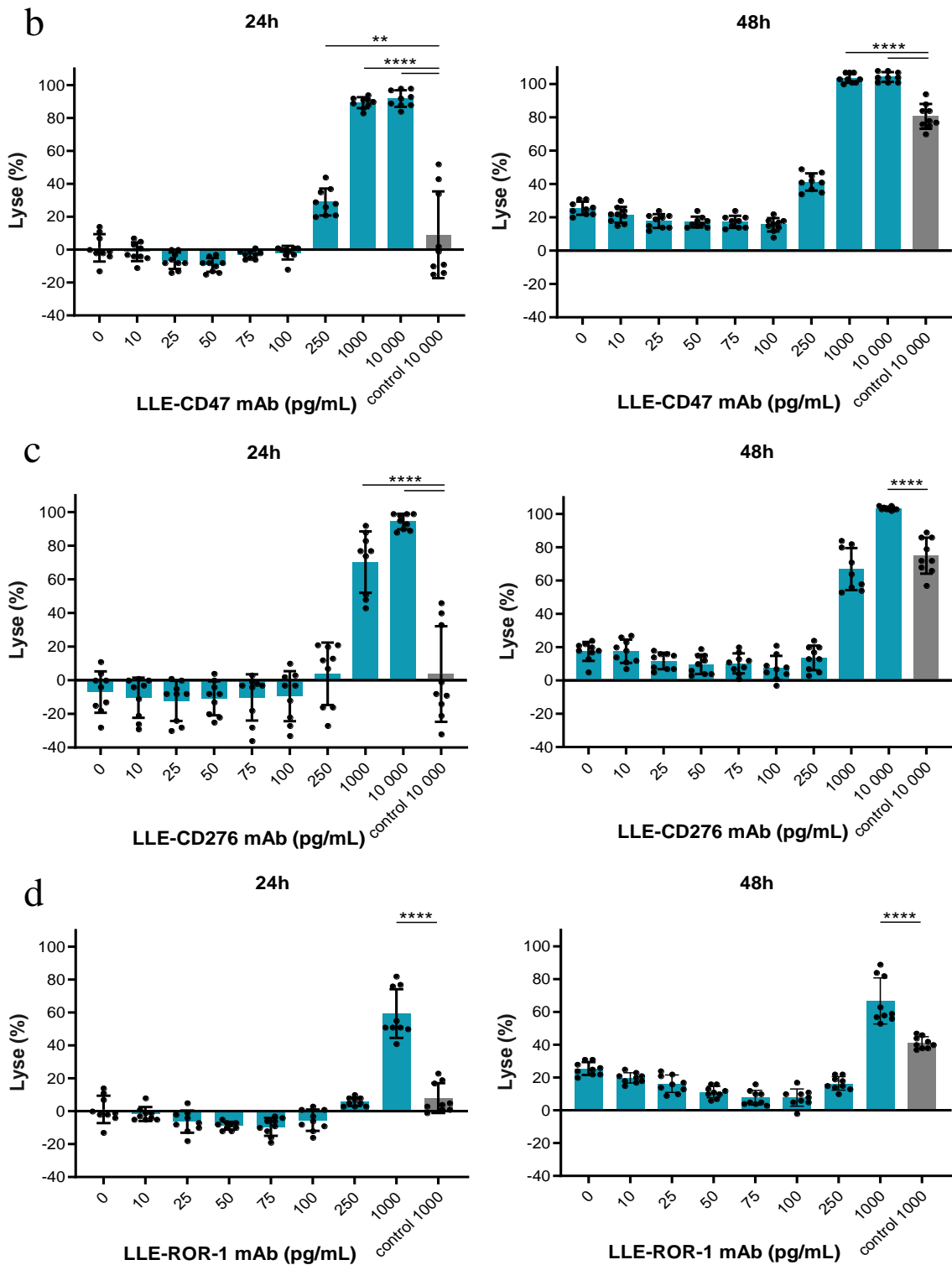


Abbildung 3.20: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Titration 10-1000/10 000 pg/mL

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-EGFR mAb** (a), **LLE-CD47 mAb** (b), **LLE-CD276 mAb** (c) und **LLE-ROR-1 mAb** (d) in verschiedenen Konzentrationen (türkis) sowie ein Kontrollantikörper (grau) eingesetzt; E:T-Ratio=5:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=3 unabhängige Experimente mit einem Donor mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.4.4.4 Multiples Targeting

LLE-EGFR mAb, LLE-CD276 mAb, LLE-ROR-1 mAb und LLE-CD47 mAb wurden jeweils mit einer Konzentration von 150 pg/mL in der LLE-mAb-Kombination eingesetzt (siehe Abbildung 3.21). Die induzierte spezifische Tumorlyse wurde mit der Lyse durch einen biotinylierten Kontrollantikörper mit der Konzentration 450 pg/mL und ohne LLE-mAb verglichen. Nach 24 Stunden führte LLE-EGFR mAb mit einer Konzentration von 150 pg/mL zu 28 % Lyse, LLE-CD47 mAb mit 150 pg/mL zu 31 % Lyse, LLE-CD276 mAb mit 150 pg/mL zu 7 % Lyse, LLE-ROR-1 mAb mit 150 pg/mL zu 7 % Lyse der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 450 pg/mL zu durchschnittlich 23 % Lyse.

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 24 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 79 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

Nach 48 Stunden führte LLE-EGFR mAb mit einer Konzentration von 150 pg/mL zu 40 % Lyse, LLE-CD47 mAb mit 150 pg/mL zu 50 % Lyse, LLE-CD276 mAb mit 150 pg/mL zu 27 % Lyse, LLE-ROR-1 mAb mit 150 pg/mL zu 22 % Lyse der Target-Zellen. Der Kontrollantikörper führte mit 450 pg/mL zu durchschnittlich 29 % Lyse.

Die LLE-mAb-Kombination führte nach 48 Stunden zu einer durchschnittlichen Tumorlyse von 90 %, die im Vergleich zu den einzelnen LLE-mAb und den Kontrollen signifikant höherer war.

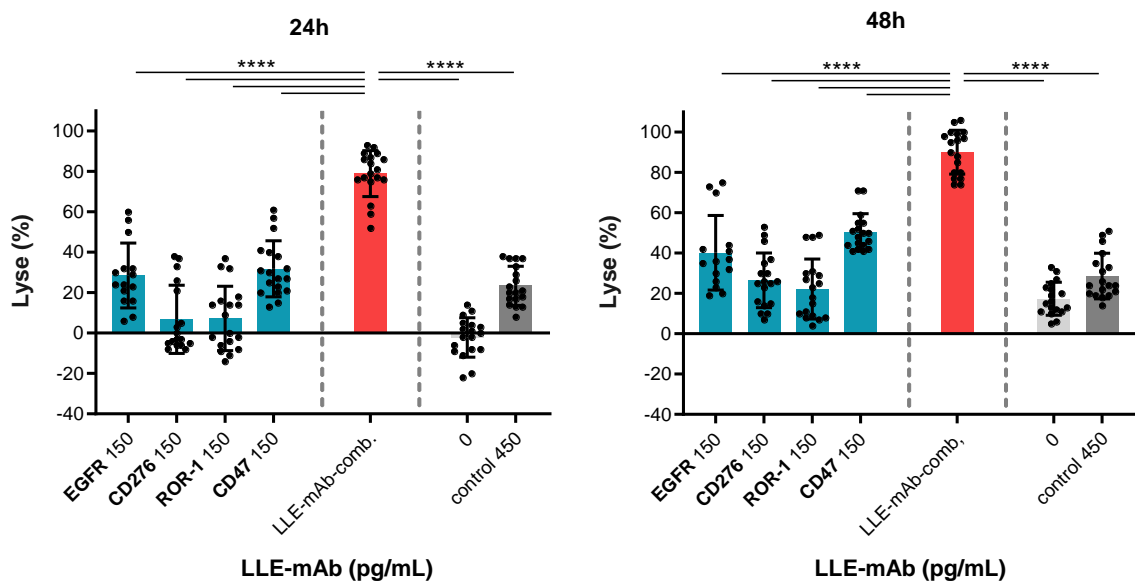


Abbildung 3.21: AdCAR-T-Zellen vs. HS-578T Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-EGFR mAb**, **LLE-CD47 mAb**, **LLE-CD276 mAb** und **LLE-ROR-1 mAb** einzeln (türkis) und in Kombination (rot) eingesetzt; Vergleich zu einem Kontrollantikörper (dunkelgrau) und einer Mediumkontrolle (hellgrau); E:T-Ratio=5:1; Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit; n=5 unabhängige Experimente mit zwei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten bzw. sechs technischen Replikaten bei den Konditionen „LLE-mAb-comb.“ und „0“; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.5 Durchflusszytometrie-basierte Zytotoxizitätsassays

Die AdCAR-T-Zellen-vermittelte Zelllyse wurde zusätzlich in Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays untersucht (Durchführung und Auswertung siehe Kapitel 2.6.2).

3.5.1 JeKo-1 (B-NHL)

3.5.1.1 Sequenzielles Targeting

Beim synchronen *Targeting* lysierten AdCAR-T-Zellen nach 48 Stunden mit dem Einsatz eines AM (LLE-CD19 mAb, LLE-CD20 mAb oder LLE-ROR-1 mAb) mit 10 ng/mL zu durchschnittlich 96 % spezifisch Zielantigen-positive Zellen, während Zielantigen-negative Zellen ausgespart wurden (3 % Lyse) (siehe Abbildung 3.22).

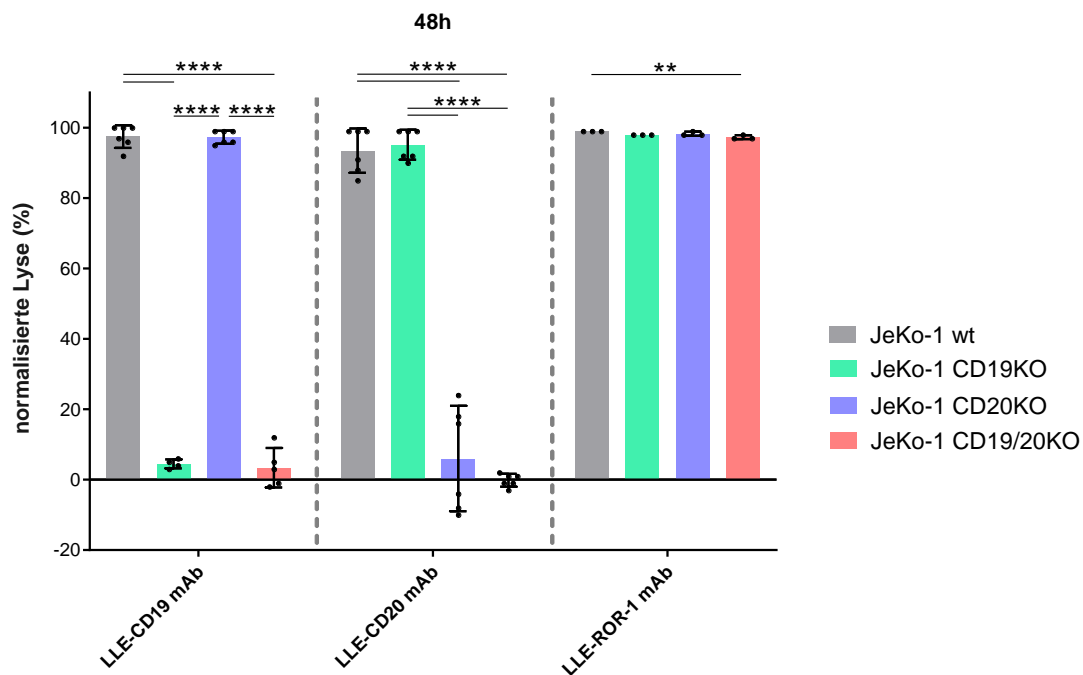


Abbildung 3.22: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - Zielantigen-spezifisches Targeting

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays erfolgte die Zielantigen-spezifische Lyse der vier Zelllinien **JeKo-1 wt** (grau), **JeKo-1 CD19KO** (türkis), **JeKo-1 CD20KO** (blau) und **JeKo-1 CD19/20KO** (rot) mit den biotinylierten monoklonalen Antikörpern (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb**, **LLE-CD20 mAb** und **LLE-ROR-1 mAb** jeweils mit der Konzentration von 10 ng/mL; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit zwei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

Beim sequenziellen *Targeting* wurden nach 48 Stunden andere LLE-mAb mit jeweils 10 ng/mL zusätzlich hinzugefügt und erneut 24 Stunden inkubiert, sodass weitere Zielantigen-positive Target-Zellen lysiert wurden (siehe Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Bei den Kontrollen (ohne LLE-mAb) kam es im Verlauf der Messungen zu einer gleichmäßigen Proliferation aller Zelllinien (siehe mittlere Zeile Abbildung 3.23). Beim Einsatz von zwei AM (LLE-CD19 mAb und LLE-CD20 mAb) wurden die Antigen-positiven JeKo-1 Populationen (JeKo-1 wt, JeKo-1 CD19 KO, JeKo-1 CD20 KO) zu durchschnittlich 96 % lysiert, während die Zielantigen-negative JeKo-1 CD19/20 KO-Zelllinie vollständig ausgespart wurde (-3 % Lyse) (siehe Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Beim zusätzlichen Einsatz von LLE-ROR-1 mAb lysierten die AdCAR-T-Zellen alle vier Varianten der JeKo-1-Zelllinien zu durchschnittlich 92 % (siehe Abbildung 3.24).

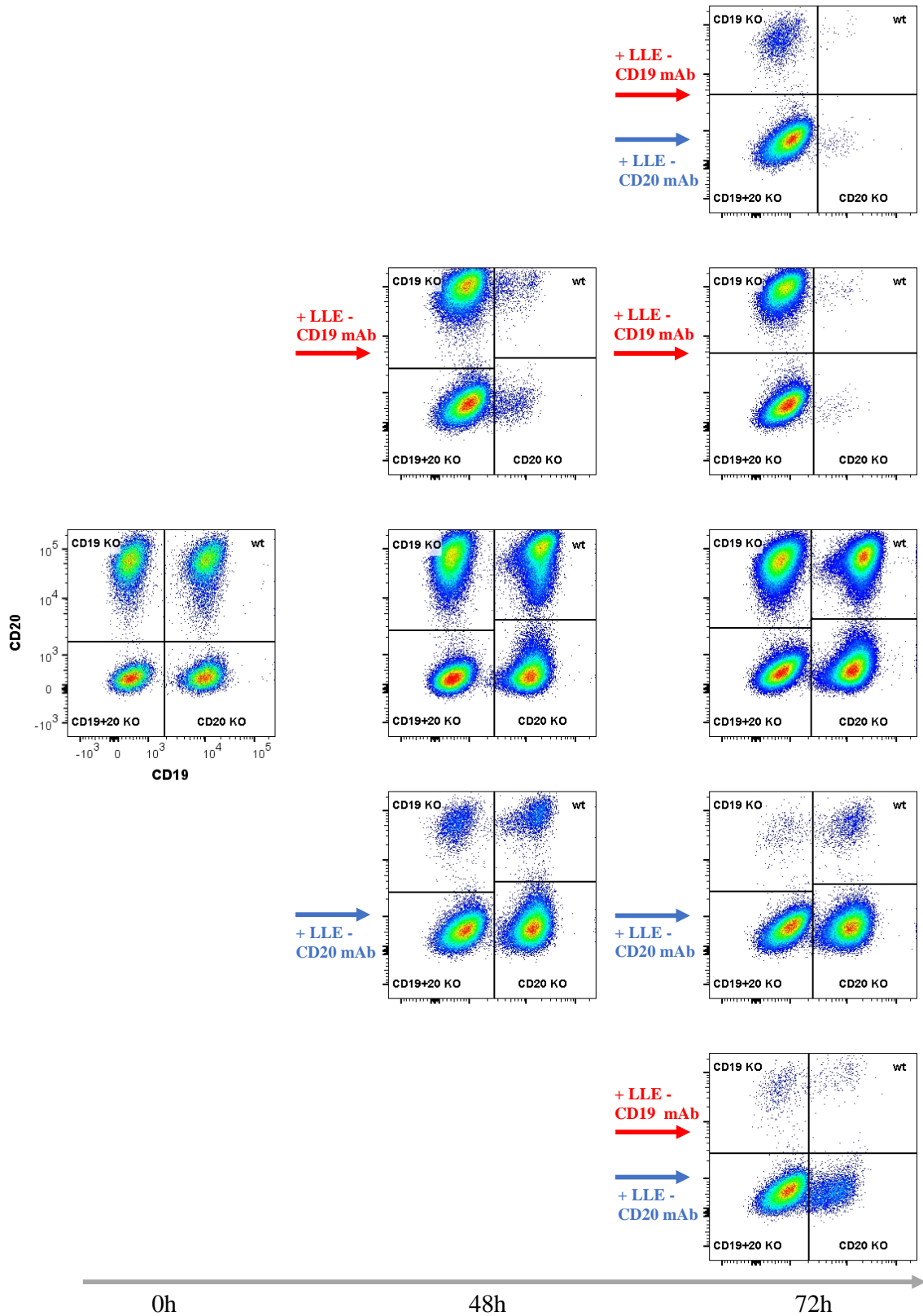


Abbildung 3.23: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - sequenzielles Targeting

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays erfolgte die Zielantigen-spezifische Lyse der vier Zelllinien **JeKo-1 wt**, **JeKo-1 CD19KO**, **JeKo-1 CD20KO** und **JeKo-1 CD19/20KO** mit den biotinylierten monoklonalen Antikörpern (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** (roter Pfeil) und **LLE-CD20 mAb** (blauer Pfeil) jeweils mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL zu jedem Zeitpunkt; E:T-Ratio=2:1; repräsentative Darstellung der Ergebnisse nach 0, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit zwei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Zellen wurden zunächst 48 Stunden lang mit einem Adaptermolekül (LLE-CD19 mAb oder LLE-CD20 mAb) inkubiert. Anschließend wurde der jeweils andere LLE-mAb (entsprechend des Schaubildes) mit der Konzentration von 10 ng/mL für weitere 24 Stunden eingesetzt.

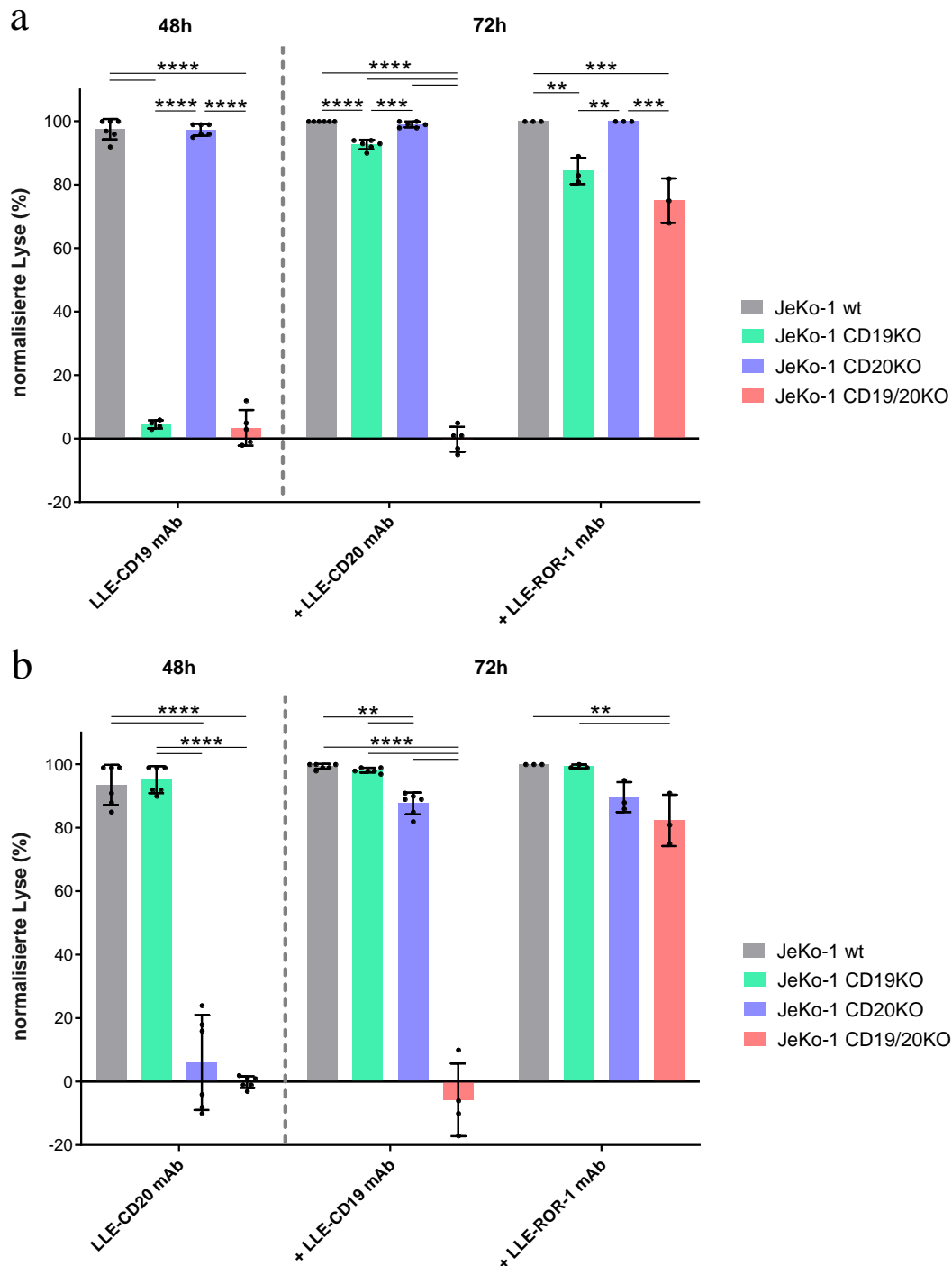


Abbildung 3.24: AdCAR-T-Zellen vs. JeKo-1 Zelllinien - sequenzielles Targeting

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays erfolgte die Zielantigen-spezifische Lyse der vier Zelllinien **JeKo-1 wt** (grau), **JeKo-1 CD19KO** (türkis), **JeKo-1 CD20KO** (blau) und **JeKo-1 CD19/20KO** (rot) mit den biotinylierten monoklonalen Antikörpern (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb**, **LLE-CD20 mAb** und **LLE-ROR-1 mAb** jeweils mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL; E:T-Ratio=2:1; Ergebnisse nach 48 und 72 Stunden Inkubationszeit; n=2 unabhängige Experimente mit zwei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey. Die Zellen wurden zunächst 48 Stunden lang mit LLE-CD19 mAb (a) oder LLE-CD20 mAb (b) und anschließend weitere 24 Stunden mit dem jeweils anderen LLE-mAb und LLE-ROR-1 mAb inkubiert. Negativ berechnete Werte der Lyse entsprachen einer Proliferation der Zellen.

3.5.2 Nalm-6 (BCP-ALL)

3.5.2.1 Antigenexpression gesunder B-Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurde die relative Antigenexpression gesunder B-Zellen aus dem Vollblut gesunder Donoren untersucht (Durchführung siehe Kapitel 2.3.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 und Tabelle 3.7 dargestellt.

Gesunde, reife B-Zellen exprimierten im Vergleich zu pathologischen B-Zellen der Zelllinie Nalm-6 CD19 (100 %), nicht jedoch CD10 (2 %) oder CD138 (3 %). Aus dieser Erkenntnis ergeben sich neue potenzielle Antikörperkombinationen für das differenzielle *Targeting* der AdCAR-T-Zell-Therapie.

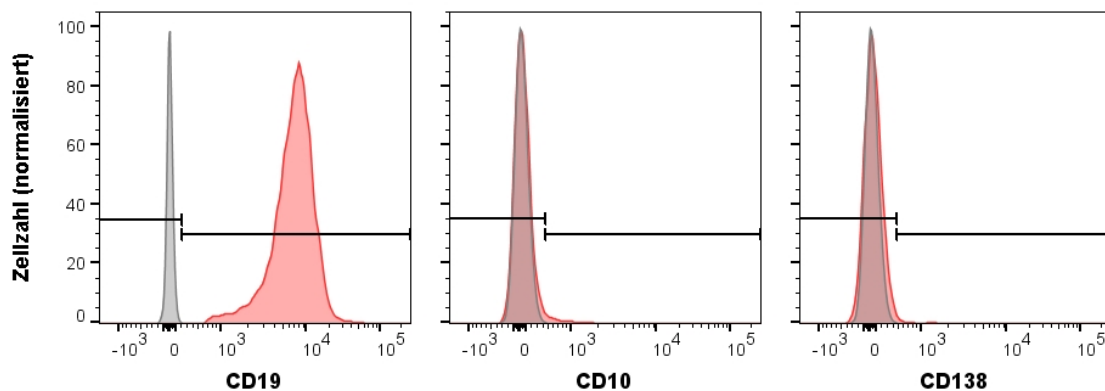


Abbildung 3.25: Antigenexpression der PBMC

Die Expression der Antigene CD19, CD10 und CD138 auf PBMC (rot) wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Isotypkontrolle (grau) verglichen (n=1). Die Gates dienen der Bestimmung der prozentualen Antigenexpression der Tumorzellen.

Tabelle 3.7: Prozentuale Antigenexpression und MFI-Ratio der PBMC

Die Expression der Antigene CD19, CD10 und CD138 auf PBMC wurde mittels indirekter Antikörperfärbung (APC) durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in Bezug auf eine Isotypkontrolle berechnet (n=1).

	PBMC	
Antigen	Expression (%)	MFIR
CD19	100	1117
CD10	3	1
CD138	2	2

Legende Expression (%)			
> 90	50-90	10-50	< 10

Legende MFIR			
> 20	< 20	< 5	< 2

3.5.2.2 LLE mAb-Titration

In einem Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassay wurden die Zellen der Tumorzelllinie Nalm-6 sowie die frisch isolierten, gesunden B-Zellen in Kokultur 48 Stunden lang mit LLE-CD19 mAb, LLE-CD10 mAb und LLE-CD138 mAb inkubiert (siehe Abbildung 3.26). In der Kontrolle (ohne LLE-mAb) blieben die frisch isolierten, gesunden B-Zellen und Nalm-6 Zellen zu durchschnittlich 100 % vital.

LLE-CD19 mAb wirkte in den Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays der Tumorzelllinie Nalm-6 als ein besseres AM als LLE-CD10 mAb und LLE-CD138 mAb und vermittelte im Gegensatz zu den anderen LLE-mAb über das gesamte Spektrum der Titration von 10 bis 1000 pg/mL eine Lyse der Nalm-6 Zellen (siehe Abbildung 3.8 in Kapitel 3.4.1.3).

In diesem Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassay führten LLE-CD10 mAb und LLE-CD138 mAb ab einer Konzentration von 1 ng/mL zu 95 % Lyse der Nalm-6 Zellen, während LLE-CD19 mAb die Tumorzellen bereits ab 0,1 ng/mL zu 99 % lysierte. Es bestätigte sich die bereits ermittelte Antigenexpression der gesunden B-Zellen (siehe Kapitel 3.5.2.1). Die AdCAR-T-Zellen lysierten die gesunden B-Zellen nur mit LLE-CD19 mAb als AM (ab 10 ng/mL zu durchschnittlich 92 %). Beim *Targeting* mit LLE-CD10 mAb oder LLE-CD138 mAb wurden die frisch isolierten B-Zellen vollständig ausgespart (durchschnittlich 0 % Lyse). Dadurch könnte ein kombinatorisches *Targeting* der Tumorzellen bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität auf die gesunden B-Zellen ermöglicht werden (siehe Kapitel 3.5.2.3 Differenzielles *Targeting*).

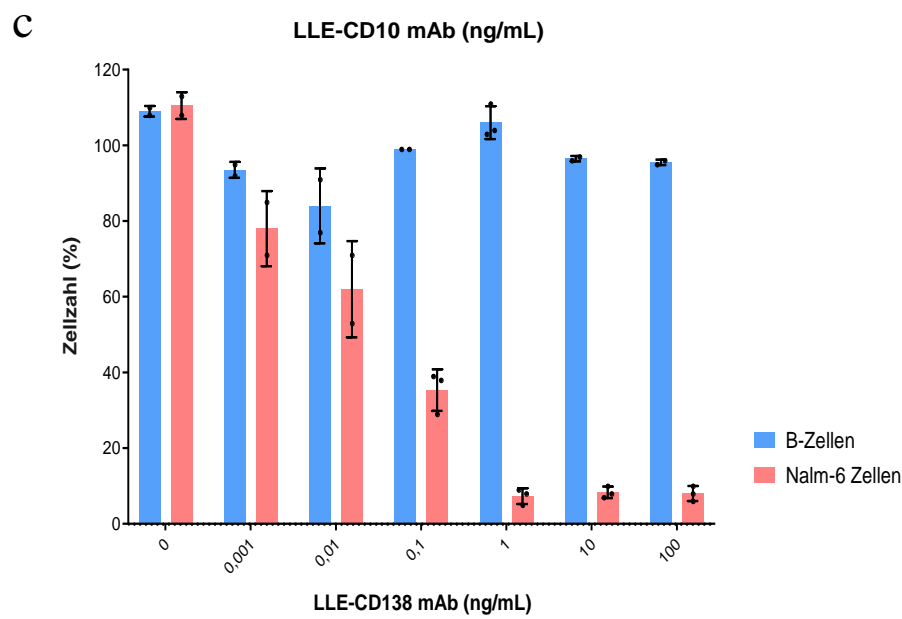
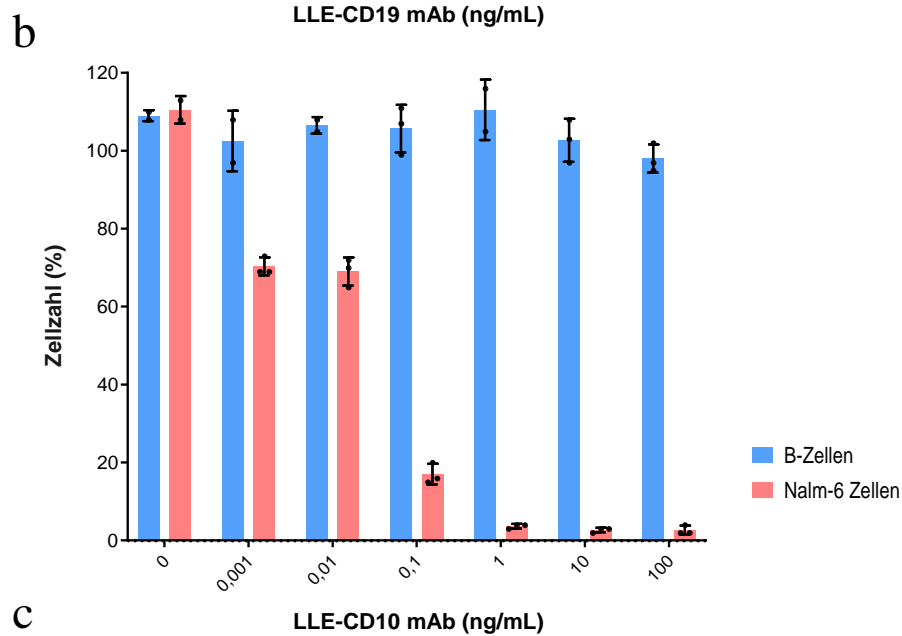
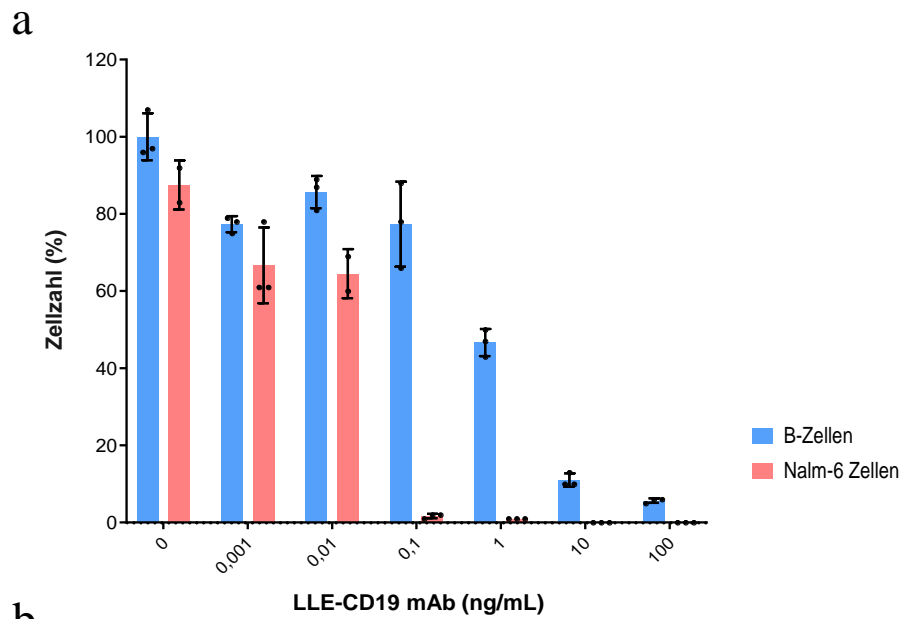


Abbildung 3.26: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Titration 0,001-100 ng/mL

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays erfolgte die Titration der biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** (a), **LLE-CD10 mAb** (b) und **LLE-CD138 mAb** (c) in verschiedenen Konzentrationen; E:T (AdCAR-T-Zellen:Nalm-6 Zellen:B-Zellen)-Ratio=2:1:5; Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubationszeit, n=1 mit jeweils drei technischen Replikaten.

3.5.2.3 Differenzielles Targeting

In den folgenden Experimenten wurde nach 48 Stunden die AdCAR-T-Zellen-vermittelte Zytotoxizität auf gesunde B-Zellen in Kokultur beim *Targeting* von malignen B-Zellen der Zelllinie Nalm-6 untersucht (siehe Abbildung 3.27 und Abbildung 3.28).

In der Kontrolle (ohne LLE-mAb) blieben die frisch isolierten, gesunden B-Zellen und Nalm-6 Zellen zu durchschnittlich 100 % vital bzw. wurden auf 100 % normalisiert.

Beim einzelnen *Targeting* mit jeweils subtherapeutischen Konzentrationen der AM war die Lyse der Target-Zellen sehr gering. Die gesunden B-Zellen blieben beim *Targeting* mit LLE-CD19 mAb (10 pg/mL) zu 94 % sowie mit LLE-CD10 mAb (10 pg/mL) und LLE-CD138 mAb (100 pg/mL) zu 100 % vital. Die malignen Nalm-6 Zellen blieben beim *Targeting* mit LLE-CD19 mAb (10 pg/mL) zu 90 % sowie mit LLE-CD10 mAb (10 pg/mL) zu 95 % und LLE-CD138 mAb (100 pg/mL) zu 92 % am Leben.

Beim *Targeting* mit LLE-CD19 mAb in der hohen Konzentration von 100 pg/mL wurden die gesunden B-Zellen zu 81 % ausgespart, während die Nalm-6 Zellen fast vollständig lysiert wurden. Lediglich 6 % der Nalm-6 Zellen blieben vital.

Beim kombinatorischen *Targeting* wurden die gesunden B-Zellen zu 99 % ausgespart, während die Tumorzellen zu lediglich 60 % am Leben blieben.

Die spezifische Tumorlyse der Nalm-6 Zellen war durch die LLE-mAb-Kombination (40 %) im Vergleich zu der induzierten Lyse durch die einzelnen LLE-mAb (0 bis 6 %) signifikant höher. Die gesunden B-Zellen wurden sowohl beim *Targeting* mit einzelnen LLE-mAb in jeweils subtherapeutischen Konzentrationen als auch bei der LLE-mAb-Kombination fast vollständig ausgespart.

Nach 48 Stunden war die Spontanlyse der B-Zellen im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten Zellzahl sehr hoch (> 50 %), während die Target-Zellen in der Kontrolle ohne LLE-mAb deutlich proliferierten. Die frisch isolierten, gesunden B-Zellen wurden mit einem Verhältnis von 5:1 zu den Nalm-6 Target-Zellen eingesetzt. Nach 48 Stunden betrug das Verhältnis 1:2.

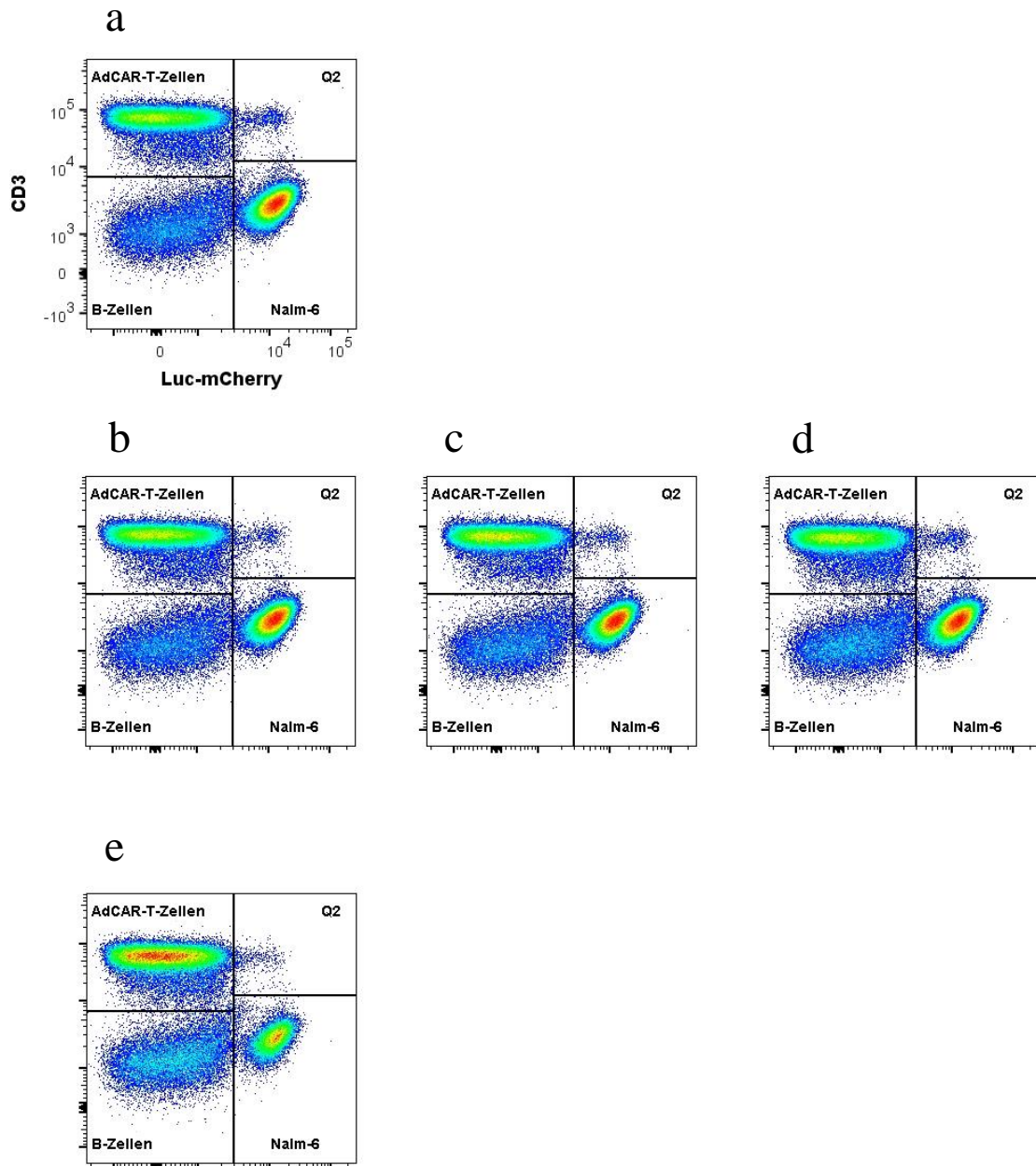


Abbildung 3.27: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** mit 10 pg/mL (b), **LLE-CD10 mAb** mit 10 pg/mL (c) und **LLE-CD138 mAb** mit 100 pg/mL (d) einzeln sowie in Kombination (e) eingesetzt; Vergleich zu einer Kontrolle ohne LLE-mAb (a); E:T (AdCAR-T-Zellen:Nalm-6 Zellen:B-Zellen)-Ratio=2:1:5; repräsentative Darstellung der Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubationszeit; n=9 unabhängige Experimente mit drei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten.

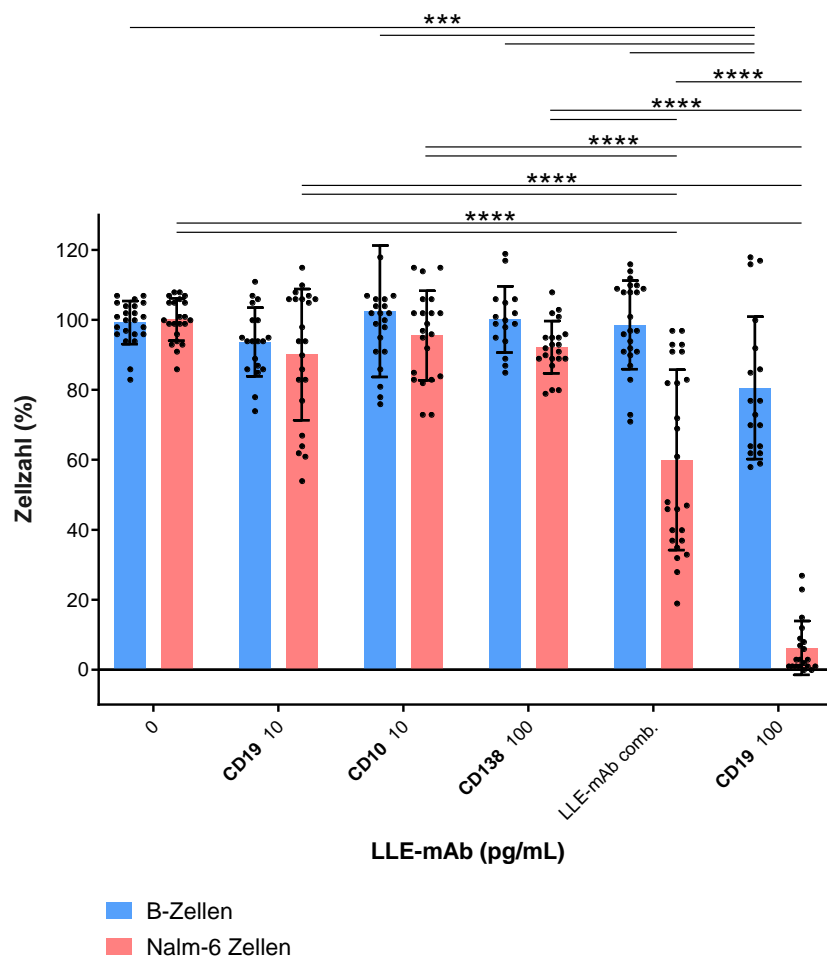


Abbildung 3.28: AdCAR-T-Zellen vs. Nalm-6/gesunde B-Zellen - LLE-mAb-Kombination

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays wurden die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) **LLE-CD19 mAb** mit 10 pg/mL, **LLE-CD10 mAb** mit 10 pg/mL und **LLE-CD138 mAb** mit 100 pg/mL einzeln sowie in Kombination eingesetzt; Vergleich zu einer Kontrolle ohne LLE-mAb und mit LLE-CD19 mAb 100 pg/mL; E:T (AdCAR-T-Zellen:Nalm-6 Zellen:B-Zellen)-Ratio=2:1:5; Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubationszeit; n=9 unabhängige Experimente mit drei Donoren mit jeweils drei technischen Replikaten; statistische Auswertung mit One-way ANOVA, post-Test-Tukey.

4 Diskussion

4.1 Bedarf einer CAR-T-Zell-Therapie - AdCAR-T-Zell-System als vielversprechender Behandlungsansatz

Die Heilungsraten vieler Tumorerkrankungen sind mit herkömmlichen Therapien noch immer begrenzt und die akuten sowie chronischen Nebenwirkungen, insbesondere bei Kindern, gravierend (siehe Kapitel 1) [3, 4].

In der Medizin besteht ein großer Bedarf an einer flexiblen, kontrollierbaren und effizienten Tumorthherapie. Die CAR-T-Zell-Therapie könnte in der Zukunft eine komplementäre Rolle einnehmen. Die großen Herausforderungen der zielgerichteten Tumorthherapie wie Antigenverlust des Tumors sowie akute und chronische Nebenwirkungen, insbesondere die *on target, off tumor*-Toxizität, müssen hierzu besser adressiert werden.

Eine erfolgreiche Therapie mit CAR-T Zellen, das heißt eine Heilung durch eine einzelne Anwendung eines CAR-T-Zell-Produkts, konnte bislang nur bei B-phänotypischen Malignomen erreicht werden [162]. Insbesondere aufgrund der beeindruckenden Wirksamkeit bei der B-phänotypischen ALL [128, 129, 132], wurde eine mittlerweile Jahrzehnte alte Bestrebung, Tumore mit dem Immunsystem zu heilen, zu neuem Leben erweckt. Die Erfolge mit CAR-T Zellen geben Hoffnung, dass eine breitere Anwendung in Zukunft Wirklichkeit werden könnte [162].

Ein wesentlicher Schritt, die CAR-T-Zell-Therapie sicherer zu gestalten, wurde durch verschiedene Ansätze verfolgt. Dazu zählen ansteuerbare Suizidgene, wie beispielsweise die Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV-tk) und die induzierbare Caspase 9 (iCasp9) [163, 164] oder Eliminationsantigene wie CD20 oder EGFR, die pharmakologisch angesteuert werden können [165-167]. Durch diese Mechanismen kann die CAR-T-Zellen-induzierte Zellyse und Toxizität jederzeit, jedoch irreversibel unterbrochen werden.

Die AdCAR-T-Zell-Therapie bietet durch das Einbringen von Adaptermolekülen und die Trennung von Antigenerkennung und T-Zell-Aktivierung viele Möglichkeiten. AdCAR-T-Zellen induzieren nur in Anwesenheit eines Adaptermoleküls ihre spezifische Funktion (siehe Abbildung 1.3). Bei Abwesenheit von LLE-mAb konnte eine Inaktivität

der AdCAR-T-Zellen durch fehlende Lyse nachgewiesen werden [168]. Die AdCAR-T-Zellen-induzierte Toxizität kann (beispielsweise im Falle eines CRS) im Gegensatz zum CAR-T-Zell-System also jederzeit flexibel unterbrochen und moduliert werden. Die Inaktivität der AdCAR-T-Zellen kann darüber hinaus aktiv über Absättigung mit mAb ohne LLE, das heißt ohne Biotinylierung im Rahmen einer kompetitiven Hemmung, erreicht werden. Eine An- und Abschaltbarkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie konnte daher nachgewiesen werden [168, 169]. Die flexible Ansteuerung, das heißt Aktivierung von AdCAR-T-Zellen, stellt beim Auftreten von Nebenwirkungen oder bei einem späteren Rezidiv einer Tumorerkrankung einen großen Vorteil gegenüber der CAR-T-Zell-Therapie dar.

CAR-T-Zellen können nach Infusion über viele Jahre im menschlichen Organismus persistieren [142, 170, 171]. Sie eignen sich daher als potenziell lebenslängliche Therapie [142]. Aufgrund ihrer Persistenz sind Kontrollierbarkeit und Sicherheit wichtige Ansprüche an diese Tumorthherapie, die von AdCAR-T-Zellen erfüllt werden könnten [168].

Die Verwendung von biotinylierten AM in der AdCAR-T-Zell-Therapie birgt Chancen und Herausforderungen. Körperfremde Markerstrukturen der AM könnten möglicherweise zu B- und T-Zellen-vermittelten Abstoßungsreaktionen führen [148, 168, 172], weshalb körpereigene Moleküle wie Biotin von Vorteil sein könnten. Wären die AdCAR-T-Zellen direkt gegen das Biotin der AM gerichtet, könnten sie ebenfalls durch körpereigenes Biotin aktiviert oder blockiert werden. Bei Induktion von Antikörpern gegen die LLE-Struktur (Biotinylierung) wäre das System in kürzester Zeit immunologisch inert [173]. Tamada *et al.* bestätigten das Prinzip mit einem anderen CAR-T-Zell-Adaptersystem *in vivo* im Mausmodell: Unspezifische FITC-markierte Adapter konnten Anti-FITC-CAR-T-Zellen absättigen und dadurch deren zytolytische Aktivität kompetitiv reduzieren [148].

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen besitzen eine scFv, die von dem murinen Antikörperklon mBio3 abgeleitet wurde. Sie sind gegen Biotin im Kontext einer spezifischen chemischen Linkerstruktur, hier als LLE bezeichnet, gerichtet (siehe Kapitel 1.6) [168]. Biotin-LLE kann an eine beliebige Proteinstruktur (AM) konjugiert werden und bietet daher theoretisch viele Möglichkeiten im klinischen Einsatz von

AdCAR-T-Zellen. Es können AM mit unterschiedlichen pharmakokinetischen und -dynamischen sowie funktionellen Eigenschaften wie beispielsweise *full-size* mAb oder Antigen-bindende Fragmente (englisch *antigen-binding fragment*, Fab) generiert werden [174, 175]. Fab-AM ohne Fc-Domäne könnten in der klinischen Anwendung von Vorteil sein, da sie im Vergleich zu *full-size* mAb-AM eine kürzere Halbwertszeit und geringere Größe haben, wodurch ihr Transport zum Tumor und die Kontrollierbarkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie verbessert werden könnte [176].

Durch das AdCAR-T-Zell-System können die Effizienz und die Patientensicherheit verbessert [174, 175] und eine universelle Anwendbarkeit erleichtert werden. Zusätzlich kann das AM im Falle einer Immunevasion (zum Beispiel durch Antigenverlust des Tumors) flexibel verändert werden [148, 177, 178]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie bei fluiden und soliden Tumoren *in vitro* nachgewiesen. AM bzw. Zielantigene, die sich als ungeeignet herausstellten, wurden beim multiplen *Targeting* flexibel ausgetauscht oder variiert. Auf diese Weise wurde beispielsweise ein Antigenverlust des Tumors simuliert und erfolgreich behandelt.

AdCAR-T-Zellen können für humanmedizinische klinische Studien GMP-gerecht hergestellt werden [168].

4.2 Anwendung der AdCAR-T-Zell-Therapie bei soliden Tumoren

Die Immuntherapie mit CAR-T-Zellen erzielte bisher lediglich bei hämatologischen Malignomen zuverlässige therapeutische Erfolge, während bei soliden Tumoren nur einzelne Patienten erfolgreich behandelt werden konnten [179, 180]. Es bestehen weiterhin zahlreiche Herausforderungen.

Bei soliden und fluiden Tumorzelllinien sind in dieser Arbeit *in vitro* vergleichbare Ergebnisse mit AdCAR-T-Zellen erreicht worden, was ihre potenzielle klinische Anwendbarkeit bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen in Zukunft zeigt.

Bisherige Hindernisse der CAR-T-Zell-Therapie bei soliden Tumoren sind die Identifizierung von spezifischen Zielantigenen [181], der Transport der CAR-T-Zellen zum Tumor, deren Aktivierung und Proliferation sowie deren *in vivo on target, off tumor*-Toxizität [179, 180]. Über diese T-Zellen-intrinsischen Eigenschaften hinaus behindert ein komplexes und dynamisches immunsuppressives Tumormikroumfeld in soliden Tumoren die T-Zell-Wirksamkeit und -Proliferation. Tumorzellen induzieren

regulatorische T-Zellen, myeloische Suppressorzellen und tumorassoziierte Makrophagen (TAM). Diese wiederum schütten hemmende Zytokine wie IL-4, IL-10, den Leukämie-inhibierenden Faktor und den transformierenden Wachstumsfaktor (englisch *transforming growth factor*, TGF)- β aus, um die T-Zell-Funktion zu unterdrücken [182-184]. Darüber hinaus reduzieren myeloische Suppressorzellen und TAM die lokalen Tryptophanspiegel im Tumorumfeld [185], wodurch den CAR-T-Zellen eine für ihre optimale Funktion essenzielle Aminosäure entzogen wird. Zusätzlich exprimieren viele Tumore den programmierten Zelltod-Liganden 1 (englisch *programmed death-ligand 1*, PD-L1), welcher mit dem programmierten Zelltod-Protein 1 (englisch *programmed cell death protein 1*, PD-1) auf aktivierten T-Zellen interagiert und der Immunevasion dient [186]. Diese Interaktion zwischen Effektor- und Target-Zellen schränkt die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen bei soliden Tumoren ein [180]. Mittels CRISPR/Cas 9 generierten Hu et al. einen PD-1-Knockout in CAR-T-Zellen, um die genannte supprimierende Interaktion zu unterbinden. Dies hatte geringe Auswirkungen auf die Proliferation der CAR-T-Zellen, führt jedoch zu einer stark erhöhten Zytokinproduktion und zytolytischen Wirkung der CAR-T-Zellen [187]. Alternativ potenziert die Kombination von AdCAR-T-Zellen und Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Antikörper (Checkpoint-Inhibitoren) deren Zytotoxizität auf solide Tumore [188]. Derzeit sind mehrere Checkpoint-Inhibitoren im klinischen Einsatz zur Behandlung verschiedener solider Malignome und Lymphome [189].

Experimentell konnte außerdem der Transport von CAR-T-Zellen zu soliden Tumoren durch Koexpression von Chemokinrezeptoren [190] und deren Verabreichung in Tumornähe (zum Beispiel intraperitoneal, intrapleural oder intrathekal) [191] verbessert werden. Ein anderer Ansatzpunkt wäre die Gefäßversorgung des Tumors: Tumornekrosefaktor (TNF)- α reguliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen hoch und verbessert die T-Zell-Infiltration [192]. Daher stellen genetisch modifizierte CAR-T-Zellen, die TNF- α sezernieren, eine mögliche Lösung dar.

Zusätzlich kann die Kombination von CAR-T-Zellen mit Lenalidomid (Immunmodulator) die Interaktion zwischen Effektor- und Target-Zellen und die Persistenz der CAR-T-Zellen *in vivo* verbessern [193].

Des Weiteren muss mit einer intratumoralen Heterogenität der Antigene sowie einer Heterogenität zwischen Primärtumor und Metastasen gerechnet werden [194]. Bei

bekannter Antigenexpression stellt dies kein Hindernis für die flexible AdCAR-T-Zell-Therapie dar. Eine individuelle Immunphänotypisierung des Tumors und ein umfangreiches SPIIT ermöglichen eine effektive und zielgerichtete kombinatorische LLE-mAb Therapie wie in dieser Arbeit bei Neuroblastom- und Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 3.17 und Abbildung 3.21).

Zusammenfassend zeigen die Forschungsergebnisse, dass CAR-T-Zellen solide Tumore durch das *Targeting* eines Zielantigens oft nicht ausreichend lysieren können [180, 188]. Ein potenzieller Lösungsansatz stellt die Kombination von AdCAR-T-Zellen mit genannten bestehenden Therapieformen oder das sequenzielle *Targeting* dar. Sequenzielles *Targeting* wurde in dieser Arbeit anhand von Jeko-1 wt und Knockout-Varianten untersucht und verhindert ein Versagen der AdCAR-T-Zell-Therapie durch eine Immunevasion des Tumors.

4.3 Alternative Therapiestrategien

4.3.1 Weitere CAR-T-Zell-Adaptersysteme

Verschiedene CAR-T-Zell-Adaptersysteme wurden bereits entwickelt.

Ein vielversprechendes Modell stellt das universal CAR (UniCAR)-T-Zell-System dar, bei dem die UniCAR-T-Zellen über ein an eine Antikörperdomäne gebundenes Peptidmolekül an die Antigene der Target-Zellen binden [178]. Die erste klinische, multizentrische Studie mit UniCAR-T-Zellen bei CD123-positiven, hämatologischen und lymphatischen Malignomen ist in Durchführung (Stand Dezember 2020), registriert auf ClinicalTrials.gov, identifier (NCT04230265). Weitere Forschungsgruppen konnten mit Anti-Peptid-Neoepitop (PNE)-switchable (s)-CAR-T-Zellen, die über PNE-markierte Adapter an das Zielantigen binden, bereits *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell Erfolge verzeichnen [176, 195]. Anti-FITC-CAR-T-Zellen binden über FITC-markierte Adapter [148, 169, 195] und Anti-Biotin-CAR-T-Zellen (mit Avidin- oder Streptavidin-scFv als Antikörperfragment) über Biotin-markierte Adapter [177, 196] an das Zielantigen. Hierbei ergibt sich folgende Problematik: Die Marker Avidin, Streptavidin, PNE und FITC sind körperfremd und dadurch potenziell immunogen [148, 176, 177, 196]. Dies stellt ein Sicherheitsrisiko dieser Adaptersysteme dar. Außerdem besitzen Avidin und Streptavidin eine hohe Affinität zu endogenem Biotin und können dadurch unspezifisch

abgesättigt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei den in dieser Arbeit verwendeten AM mit LLE keine Wechselwirkungen mit natürlichem Biotin beobachtet werden. Außerdem wäre die klinische Translation besonders einfach, da für die Herstellung von AM auf bereits klinisch zugelassene mAb zurückgegriffen werden könnte [168].

Anti-Fluorescein-CAR-T-Zellen binden über Fluorescein (FITC)-Folat-markierte Adapter [197] an Tumorzellen. Etwa 40 % der menschlichen Tumorarten überexprimieren den Folat-Rezeptor, während er in gesunden Geweben weitgehend fehlt oder nicht zugänglich ist [198]. Das macht den Folat-Rezeptor zu einer attraktiven Zielstruktur in der Tumorthherapie. Ein Vorteil dieses Adaptersystems stellt die sehr kurze Halbwertszeit der FITC-Folat-Adapter dar. Sie beträgt aufgrund ihres geringen Molekulargewichts < 90 Minuten [199], während die meisten Antikörper eine durchschnittliche Halbwertszeit von Tagen bis Wochen haben [200]. Dadurch könnte die Effektorfunktion und Zytokinproduktion der Anti-Fluorescein-CAR-T-Zellen beispielsweise im Fall eines CRS sehr schnell (innerhalb von 6 Stunden [197]) unterbunden werden. Beim *Targeting* einer einzigen Zielstruktur (Folat-Rezeptor) können die FITC-Folat-Adapter im Falle einer Immunevasion jedoch nicht flexibel variiert werden. Außerdem ist kein kombinatorisches *Targeting* möglich.

Die vorgestellten Adaptersysteme erreichten *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell bei fluiden [148, 169, 176, 196] und soliden Tumoren [148, 177, 195, 197] im Vergleich zu herkömmlichen CAR-T-Zellen eine ähnlich hohe und spezifische Lyse von Tumorzellen. Auch bei diesen Adaptersystemen konnte eine An- und Abschaltbarkeit nachgewiesen werden [148, 169, 176, 177, 195, 197]. Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen konnte bei den anderen Adaptersysteme jedoch nicht immer eine langfristige Persistenz *in vivo* nachgewiesen werden [148].

4.3.2 CAR-NK-Zellen

Neben T-Zellen könnten NK-Zellen ein vielversprechendes und sicheres, alternatives Vehikel für die CAR-Therapie darstellen. Sie lysieren auf eine effiziente Weise infizierte oder maligne Zellen [201]. Nach ihrer Aktivierung produzieren NK-Zellen auch Zytokine, jedoch weniger pro-inflammatorische Zytokine (wie beispielsweise TNF- α , IL-1 und -6) und verursachen daher im Gegensatz zu CAR-T-Zellen seltener ein CRS. Zusätzlich lysieren NK-Zellen (sogenannte „Serienkiller“) die Target-Zellen schneller als

T-Zellen [202]. NK-Zellen haben im Vergleich zu T-Zellen eine kürzere Lebensdauer [202], wodurch ihre Anti-Tumor-Aktivität im Vergleich zur CAR-T-Zell-Therapie zeitlich begrenzt ist. Dies hat Vor- und Nachteile: Der Behandlungszeitraum wird dadurch unwillkürlich zeitlich begrenzt. Die schnelle Lyse der Target-Zellen kann jedoch auch potenziell lebensbedrohliche Nebenwirkungen, wie beispielsweise das Tumor-Lyse-Syndrom, induzieren [203]. Im Falle eines Rezidivs müssten die CAR-NK-Zellen neu hergestellt und infundiert werden. Die Expansion und Persistenz der NK-Zellen nach der Infusion scheinen die wichtigsten Determinanten für die Induktion einer langfristigen Anti-Tumor-Wirkung zu sein [204, 205]. Im Vergleich dazu besitzen CAR-T-Zellen der zweiten und dritten Generation, die zusätzliche kostimulatorische Domänen (zum Beispiel CD28, OX-40 oder 4-1BB) enthalten, eine bessere *in vitro*- und *in vivo*-Aktivierung und Persistenz [127]. Dies ermöglicht eine langfristige Kontrolle der Tumorerkrankung.

4.3.3 Bispezifische Antikörper

Eine selektive Tumorumlyse durch die Aktivierung des Immunsystems stellt eine attraktive Strategie für die Behandlung von (metastasierten) Malignomen dar. Bispezifische Antikörper besitzen ein großes therapeutisches Potenzial: Sie bestehen aus zwei Antikörpern oder Antikörper-Fragmenten und besitzen daher zwei Antigen-bindende Domänen. Sie können dadurch gleichzeitig an ein tumorassoziertes Antigen und ein Antigen auf Lymphozyten (zum Beispiel CD3) binden. Die Vernetzung einer T-Zelle mit einer Tumorzelle mittels eines geeigneten bispezifischen Antikörpers führt zu einem MHC-unabhängigen *Retargeting* der zytolytischen Aktivität. Blinatumomab ist ein bispezifischer T-Zellen-rekrutierender Antikörper (englisch *bispecific T-cell engager*, BiTE), der gegen CD3 und CD19 gerichtet ist und bei B-phänotypischen Malignomen eingesetzt wird. Er wurde 2014 in den USA von der FDA für die Behandlung von Philadelphia-Chromosom-negativer refraktärer BCP-ALL zugelassen [175].

Ein anderer BiTE, der gegen das B-Zell-Reifungsantigen (englisch *B-cell maturation antigen*, BCMA) auf malignen Plasmazellen und CD3 gerichtet ist, konnte bei der Behandlung des Multiplen Myeloms *in vitro* und *in vivo* eine selektive Lyse vermitteln [206].

Der EpCAM/CD3-BiTE erzielte bei fortgeschrittenen soliden Tumoren (des Kolorektums, des Magens, der Lunge, der Prostata und der Brust) erste Erfolge *in vitro* und *in vivo* [207, 208].

Zusammenfassend sind die Vorteile von bispezifischen Antikörpern ihre einfache, universelle und dadurch auch theoretisch kostengünstige Herstellung. AdCAR-T-Zellen müssen für jede Person individuell hergestellt werden. Bispezifische Antikörper rekrutieren und aktivieren alle Zielantigen-positiven Zellen, zu denen je nach Zielantigen neben T-Zellen beispielsweise auch NK-Zellen gehören können (zum Beispiel CD30/CD16A-BiTE [209]). Außerdem findet eine Aktivierung der Effektorzellen über die CD3-Bindung unabhängig von der Bindung an das zweite Zielantigen statt [210]. Die dadurch entstehende unspezifische, überschießende Aktivierung von Immunzellen erklärt die risikoreiche Anwendung der bispezifischen Antikörper. In der klinischen Anwendung könnte man niemals eine Sättigung mit bispezifischen Antikörpern im Patienten erreichen, da die Toxizität und die Gefahr einer letalen Dosis zu hoch wären. Aus diesem Grund ist ihre klinische Anwendung auf sehr niedrige Dosen beschränkt [211].

Die Vorteile der AdCAR-T-Zell-Therapie sind die spezifische Aktivierung der Effektorzellen nur bei gleichzeitiger Bindung von Zielantigenen und damit ihre höhere Therapiesicherheit. Während die bispezifischen Antikörper Antigen-spezifisch sind, ist bei der Therapie mit AdCAR-T-Zellen ein flexibles *Targeting* von Zielantigenen möglich. Die Toxizität der AdCAR-T-Zell-Therapie ist beim Wirkungsoptimum der Effektorzellen erreicht und verstärkt sich nicht bei erhöhter Dosis (*Ceiling-Effekt*). Daher wäre eine zusätzlich Dosiserhöhung nicht sinnvoll. Über die Anwendung der SAM kann das maximale Wirkungsoptimum bei gleichzeitig geringer *on target, off tumor*-Toxizität erreicht werden [168].

4.4 Auswahl der Tumorzelllinien und Zielantigene

Exemplarisch für fluide und solide Tumorerkrankungen wurden in dieser Arbeit die BCP-ALL (Nalm-6), das Mantelzelllymphom (JeKo-1), das Neuroblastom (LS) und das Mammakarzinom (HS-578T) ausgesucht. Eine adäquate Luciferase-Expression der Tumorzelllinien ist Voraussetzung für die LCA und wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1).

Die AdCAR-T-Zellen können mit individuell ausgewählten LLE-mAb beliebige Zellpopulationen mit bekanntem Antigenexpressionsprofil gezielt lysieren.

Viele Antigene zahlreicher Tumorzelllinien sind bereits bekannt, werden jedoch häufig auf weiteren gesunden Körperzellen koexprimiert. Daher sollten beim *Targeting* möglichst Antigene ausgewählt werden, die auf Tumorzellen überexprimiert werden. Mittels Literaturrecherche und durchflusszytometrischer Kontrollen (siehe Kapitel 3.2) wurden folgende potenzielle und bereits etablierte Zielantigene ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

CD19, CD10, CD138 und CD22 auf Nalm-6;

CD19, CD20, CD37 und ROR-1 auf JeKo-1;

CD276, CD117, CD171, CD81 und GD2 auf LS sowie

EGFR, CD47, CD276 und ROR-1 auf HS-578T.

Die physiologische Funktion dieser Antigene erklärt ihre Bedeutung als Angriffspunkte vieler Therapiestrategien im klinischen und präklinischen Einsatz (siehe Kapitel 1.4).

4.5 Einflussfaktoren auf die Tumorlyse

In LCA konnte bei der Titration der LLE-mAb gezeigt werden, dass zur Aktivierung von AdCAR-T-Zellen eine bestimmte Schwellenkonzentration und Bindung der LLE-mAb an Antigene der Target-Zelle nötig ist (beispielsweise 1 ng/mL von LLE-EGFR mAb bei HS-578T). Lee *et al.* bestätigten diese Ergebnisse in einem anderen CAR-T-Zell-Adaptersystem: Anti-Fluorescein-CAR-T-Zellen erreichten bei soliden Tumorzelllinien lediglich bei einer AM-Dosis im Bereich des Schwellenwertes eine optimale Zytokinproduktion und Tumorlyse. Sehr hohe AM-Dosen führten zur unspezifischen Bindung der AM an Target-Zellen und Interaktion mit Effektor-Zellen, was zur Abnahme der CAR-T-Zell-Aktivität führte [197]. Ma *et al.* dagegen zeigten eine Dosis-abhängige Aktivierung von Anti-FITC-CAR-T-Zellen [169].

Durch langsames Auftitrieren der Dosis von AM in der klinischen Anwendung könnte der optimale Wirkungsbereich der AdCAR-T-Zellen bei gleichzeitiger Vermeidung von Nebenwirkungen wie einem CRS erreicht werden [169].

Die Grundaktivität der T-Zellen wird von zahlreichen hemmenden und stimulierenden Faktoren reguliert [212]. Beim kombinatorischen *Targeting* wird der Schwellenwert

durch jeweils subtherapeutische Konzentrationen der einzelnen LLE-mAb überschritten (siehe Abbildung 4.1).

Die Geschwindigkeit der spezifischen Tumorlyse ist abhängig vom E:T-Verhältnis sowie von der Aktivität, Zytokinstimulation und -sekretion der AdCAR-T-Zellen. Diese Faktoren nehmen durch eine Aktivierung der AdCAR-T-Zellen mit zunehmender Expression des Zielantigens zu [213-215]. Die Korrelation zwischen Antigenendichte und Effizienz der Lyse sowie Aktivierung und Proliferation der T-Zellen konnte auch mit CD20-spezifischen CAR-T-Zellen nachgewiesen werden [216]. Dennoch variierte die induzierte Tumorlyse und die Schwellenwertkonzentration der LLE-mAb bei vergleichbarer Antigenexpression zwischen den verschiedenen Zelllinien und innerhalb einer Zelllinie. CD19 und CD138 wurden beispielsweise auf den Nalm-6 Zellen vergleichbar exprimiert (siehe Tabelle 3.2) und vermittelten dennoch eine unterschiedlich hohe Lyse der Target-Zellen (siehe Abbildung 3.8). ROR-1 wurde auf den vier JeKo-1 Zelllinien vergleichbar exprimiert (siehe Tabelle 3.3) und induzierte beim sequenziellen *Targeting* nach 72 Stunden dennoch keine gleich hohe Lyse aller vier Zelllinien (siehe Abbildung 3.24). Scheinbar lassen sich die Tumorzellen unterschiedlich leicht durch AdCAR-T-Zellen und Zielantigen-abhängig lysieren. Im Falle von CD22 konnte durch die Verwendung eines AM, das am Zielantigen an ein distales Epitop bindet, bei B-phänotypischen Malignomen keine hohe Lyse induziert werden [169], obwohl das Zielantigen selbst auf BCL-ALL-Zelllinien relativ hoch exprimiert wird [57] (siehe LLE-CD22 mAb Titration Abbildung 3.8). Eine ähnliche Problematik zeigten Untersuchungen von Ma *et al.* mit Anti-FITC-CAR-T-Zellen bei verschiedenen B-phänotypischen Malignomen [169]. Haso *et al.* konstruierten direkte Anti-CD22-CAR-T-Zellen, die durch eine proximale Bindung am Epitop höhere Zytotoxizitäten induzierten als bei einer distalen Bindung. Die induzierte Tumorlyse entsprach *in vitro* und *in vivo* der von direkten Anti-CD19-CAR-T-Zellen [57].

Zusammenfassend ist das *Targeting* verschiedener Antigene unterschiedlich effektiv. Abhängig von der physiologischen Funktion, Regulation des Antigens und dessen prozentualer Expression hat dessen *Targeting* unterschiedliche Folgen für die Target-Zelle. Die Affinität der AM zum Antigen hängt von der Größe der extrazellulären Domäne und damit von der Bindung des Epitops (proximal versus distal) sowie den sterischen Aspekten der Zielstruktur ab [169, 176, 195, 217]. Weitere Faktoren wie die

Internalisierung des Antigens bei der Bindung eines Antikörpers und das extrazelluläre Abfangen von AM durch lösliche Antigene (wie beispielsweise bei GD2 [74]) verhindern eine AdCAR-T-Zellen-induzierte Lyse der Target-Zellen.

Das E:T-Verhältnis hat einen wichtigen Einfluss auf die AdCAR-T-Zellen-vermittelte Tumorlyse. Mit dem hohen E:T-Verhältnis von 10:1 führten die LLE-mAb bei den verschiedenen Tumorzelllinien bereits nach 24 Stunden zu einer fast vollständigen Lyse der Target-Zellen (durchschnittlich 98 %). Allerdings war in diesem Fall auch die unspezifische Aktivierung durch den Kontrollantikörper hoch (durchschnittlich 48 %), sodass niedrige E:T-Ratios für die folgenden Experimente ausgewählt wurden. Andere Forschungsgruppen mit CAR-T-Zell-Adaptersystemen wählten beim *Targeting* von B-lymphozytären Malignomen eine E:T-Ratio von 10:1 (vs. 2:1 bei Nalm-6 in dieser Arbeit) bei einer Inkubationszeit von maximal 24 Stunden [176, 196]. Für die Lyse von großen Zellen wie HS-578T benötigen AdCAR-T-Zellen im Vergleich zu kleinen Nalm-6 Zellen mit gleichem E:T-Verhältnis etwa 24 Stunden länger (vergleiche Abbildung 3.6 und Abbildung 3.18). Außerdem benötigen sie ein höheres E:T-Verhältnis, um eine annähernd 100%ige Tumorlyse nach 24 Stunden zu erreichen (5:1 bei HS-578T vs. 2:1 bei Nalm-6). Andere Forschungsgruppen mit direkten CAR-T-Zellen wählten beim *Targeting* von HS-578T niedrigere E:T-Verhältnisse von 2:1 und 1:1 (vs. 5:1 in dieser Arbeit) bei einer Inkubationszeit von maximal 48 Stunden [218, 219]. Im CAR-T-Zell-Adaptersystem müssen zur Aktivierung verschiedene Komponenten (Zielantigen + Adapter + Effektorzelle) zusammenkommen, um eine zytolytische Synapse zu bilden. Im Vergleich dazu müssen sich beim direkten CAR-T-Zell-System vereinfacht gesehen nur zwei Komponenten zusammenfügen (Zielantigen + Effektorzelle). Vermutlich benötigen direkte CAR-T-Zellen daher im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen beim *Targeting* von Tumorzellen niedrigere E:T-Verhältnisse zur CAR-T-Zell-Aktivierung.

Tumorzellen besitzen außerdem verschiedene Mechanismen, um sich vor dem Immunsystem zu schützen, wie beispielsweise die Expression von PD-L1 [186] und die Sekretion hemmender Zytokine [182-184] (siehe Kapitel 4.2). Dies schränkt die Wirkung von AdCAR-T-Zellen insbesondere bei soliden Tumoren ein [180]. Dennoch konnten bereits zahlreiche Forschungsgruppen Erfolge mit CAR-T-Zell-Adaptersystemen bei soliden Tumoren *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell verzeichnen [148, 177, 195, 197].

Je nach Konstrukt und Biotinylierung des AM sowie Länge des AdCAR-Spacers variiert die Avidität zum Zielantigen und damit auch die Effektivität der AdCAR-T-Zellen [57, 169, 176, 214].

Für alle Zytotoxizitätsassays wurde das gleiche AdCAR-T-Zell-Konstrukt verwendet. Die verwendeten LLE-mAb sind jedoch abhängig vom Herstellungsprozess vermutlich an verschiedenen Stellen und in unterschiedlichem Ausmaß biotinyliert.

Für den klinischen Einsatz von AdCAR-T-Zellen ist es relevant, die individuelle Antigenexpression des Tumors und die Antigen-abhängigen Schwellenwertkonzentrationen der LLE-mAb zu kennen, um mögliche Zielantigene für eine kombinatorische LLE-mAb-Therapie auszuwählen und die jeweilige Dosis der LLE-mAb zu bestimmen. Dadurch könnten Nebenwirkungen und *on target, off tumor*-Effekte reduziert werden.

4.6 Kombinatorisches Targeting

4.6.1 Das Prinzip der Surface Activation Matrix

Die Aktivierung der AdCAR-T-Zellen kann sowohl durch die Erhöhung der Konzentration eines einzelnen LLE-mAb als auch durch die Kombination verschiedener LLE-mAb in jeweils niedrigen Konzentrationen erreicht werden. Dieses Aktivierungsmodell wird auch als *Surface Activation Matrix* (SAM) bezeichnet (siehe Abbildung 4.1) [168].

Eine Studie mit CD20-spezifischen CAR-T-Zellen zeigte, dass für den Beginn einer CAR-T-Zellen-vermittelten lytischen Aktivität eine Dichte von etwa 200 Antigenen pro Target-Zelle nötig ist. Für eine CAR-T-Zellen-vermittelte Zytokinproduktion war eine etwa zehnfach höhere Antigendichte erforderlich [216].

Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Tumorlyse durch LLE-mAb mit der Dichte der jeweiligen Zielantigene korreliert. Andere Studien bestätigten dieses Ergebnis [177, 213-215]. Das *Targeting* von schwach exprimierten Antigenen induziert keine hohe Tumorlyse (siehe LLE-ROR-1 mAb Titration Abbildung 3.20). Es führt dennoch zu einer erhöhten Grundaktivität der AdCAR-T-Zellen, sodass die induzierte Tumorlyse durch das *Targeting* von stark exprimierten Antigenen verstärkt wird.

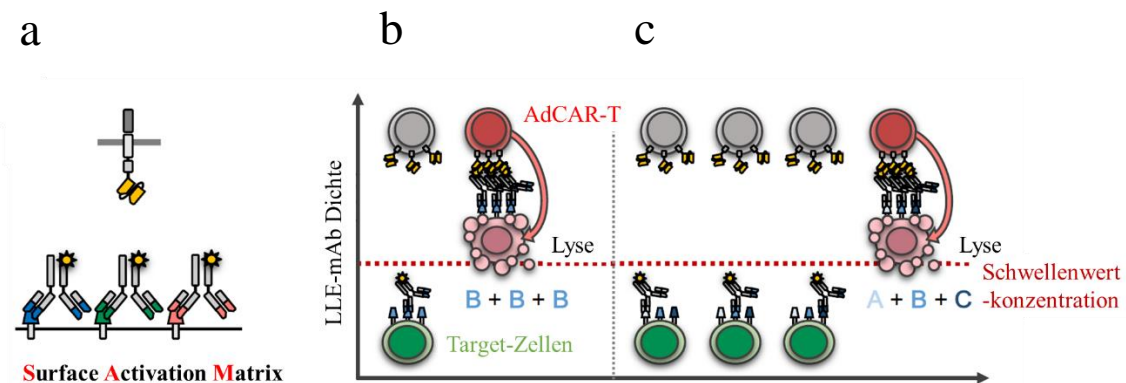


Abbildung 4.1: Prinzip der AdCAR-T-Zell-Aktivierung - Surface Activation Matrix

AdCAR-T-Zellen binden mit verschiedenen LLE-mAb als Adaptermoleküle an die Target-Zelle (a). Darstellung der inaktivierten AdCAR-T-Zelle in grau und der aktivierten in rot. Bindung der LLE-mAb an entsprechende Antigene der Target-Zellen (grün). AdCAR-T-Zellen-vermittelte Induktion der Lyse der Target-Zelle (rosa) bei Überschreiten einer Schwellenwertkonzentration der LLE-mAb. Dies kann sowohl über das *Targeting* eines Tumorantigens mit einer hohen Konzentration des einzelnen LLE-mAb (B + B + B) (b) als auch durch die Kombination verschiedener LLE-mAb (A + B + C) in jeweils subtherapeutischer Konzentration (c) erreicht werden. (Adaptiert aus [168])

Für die LLE-mAb-Kombination wurden LLE-mAb ausgewählt, die eine hohe spezifische Tumorlyse induzierten. *In vivo* könnten dadurch die Effizienz der Therapie gesteigert und potenziell lebensbedrohliche Nebenwirkungen verhindert werden.

4.6.2 Multiples Targeting

Die kombinatorische LLE-mAb-Therapie führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer hohen Lyse der Target-Zellen nach 48 Stunden (44 % bei Nalm-6, 67 % bei JeKo-1, 67 % bei LS, 90 % bei HS-578T) bei Verwendung von jeweils sehr niedrigen Konzentrationen der einzelnen LLE-mAb (≤ 100 pg/mL bei Nalm-6, ≤ 75 pg/mL bei JeKo-1, 50 pg/mL bei LS, 150 pg/mL bei HS-578T). Bei den jeweiligen Antikörperkonzentrationen der LLE-mAb handelt es sich um Werte unterhalb (subtherapeutische Konzentrationen) des bzw. am ermittelten Schwellenwert. Durch das Prinzip der SAM wird daher die AdCAR-T-Zellen-induzierte Zytotoxizität auf gesunde Zellen (*on target, off tumor*-Effekt) reduziert oder zumindest zeitlich begrenzt.

Optimalerweise sollten Zielantigene ausgewählt werden, die für den Tumor spezifisch sind, auf diesem überexprimiert werden oder lediglich auf nicht lebensnotwendigen Geweben (sogenanntes *non vital essential tissue*) exprimiert werden [220]. Insbesondere beim *Targeting* von soliden Tumoren ist dies jedoch nicht immer möglich [181]. Eine LLE-mAb-Kombination im AdCAR-T-Zell-System ermöglicht sowohl das *Targeting* von Antigenen wie CD19, die auf lebensnotwendigen Geweben exprimiert werden (sogenanntes *vital essential tissue*) [42], als auch von Antigenen wie EGFR, die universell vorkommen. Dadurch erweitert sich der Einsatz von AdCAR-T-Zellen auf sehr heterogene Tumorentitäten wie AML [220] und solide Tumore [148, 177, 195, 197].

Ma *et al.* bestätigten mit dem *Targeting* von CD19 und CD22 die flexible und spezifische Wirkung des CAR-T-Zell-Adaptersystems bei B-phänotypischen Malignomen [169].

Im Gegensatz zu AdCAR-T-Zellen lysieren CAR-T-Zellen potenziell lebenslang alle Zellen, die das Zielantigen exprimieren [142]. Es können lebensbedrohliche Situationen entstehen, wie zum Beispiel eine lebenslange Hypogammaglobulinämie durch die B-Zell-Aplasie, wenn das Antigen auf lebenswichtigem, gesundem Gewebe wie B-Zellen exprimiert wird [136]. Im Verhältnis zur Grunderkrankung handelt es sich um scheinbar erträgliche, aber dennoch sehr relevante Nebenwirkungen. Eine IgG-Substitution kann die Hypogammaglobulinämie und damit die B-Zell-Funktion zwar funktionell ersetzen, führt jedoch bei bis zu 40 % zu Nebenwirkungen wie beispielsweise starken Kopfschmerzen, Tachykardie oder grippeähnlichen Symptomen. Schwere, potenziell lebensbedrohliche Komplikationen wie anaphylaktische Reaktionen, thromboembolische Ereignisse, akute Nierenfunktionsstörungen oder eine akute Hämolyse treten selten auf [221]. Trotz IgG-Substitution haben die Betroffenen ein erhöhtes Risiko für akute Infektionen, insbesondere für Neuinfektionen wie beispielsweise COVID-19, und für die Exazerbation chronischer Erkrankungen [222]. Im Fall einer lebenslänglichen Substitution von IgG gäbe es erstens nicht ausreichend IgG für alle Betroffenen und zweitens wäre die IgG-Herstellung zu kostenintensiv.

Mit dem AdCAR-T-Zell-System kann bei klinischer Anwendung eine dauerhafte B-Zell-Aplasie verhindert werden, da es ohne AM im Adaptersystem zur Regeneration von B-Zellen kommt [169, 176].

4.6.3 Sequenzielles Targeting

In Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays mit JeKo-1 Wildtyp und CD19/CD20 Knockout-Zelllinien wurde die Situation einer Immunevasion des Tumors mit Zielantigen-negativen Subklonen simuliert (siehe 3.5.1.1 Sequenzielles *Targeting*). AdCAR-T-Zellen sind in der Lage, Zielantigen-positive Zelllinien spezifisch zu lysieren, während die jeweiligen Knockout-Varianten überleben. Urbanska *et al.* bestätigten dieses Prinzip mit einem anderen CAR-T-Zell-Adaptersystem bei soliden Tumoren: EpCAM-positive und -negative Brustkrebszelllinien wurden in Kokultur zunächst mit Anti-EpCAM-Biotin-AM und daraufhin mit Anti-FR-Biotin-AM von Anti-Biotin-CAR-T-Zellen Zielantigen-spezifisch lysiert. Beim sequenziellen *Targeting* wurde deutlich, dass AdCAR-T-Zellen die Target-Zellen nicht nur mit einer niedrigen Dosis (10 ng/ml) jedes eingesetzten LLE-mAb, sondern auch zeitlich flexibel lysieren. Nach dem Einsatz von LLE-CD19 mAb oder LLE-CD20 mAb verhindert ein zusätzliches *Targeting* mit LLE-ROR-1 mAb nach 48 Stunden die Selektion einer Zelllinie durch zweifachen Antigenverlust (JeKo-1 CD19/CD20 KO). Durch zeitlich versetztes, sequenzielles *Targeting* verschiedener Antigene kann die Toxizität auf gesunde Zellen verringert und die AdCAR-T-Zell-Therapie im Rahmen einer SPIIT jederzeit flexibel und individuell neu angepasst werden. Auf diese Weise können Therapieversagen durch Antigenverlust des Tumors vermieden werden.

4.6.4 Differenzielles Targeting

Die verschiedenen Antigenexpressions-Muster von Zellen ermöglichen eine Auswahl von LLE-mAb, die in dieser Kombination für die Tumorzellen spezifisch sind (siehe Abbildung 4.2). Dadurch können AdCAR-T-Zellen beim differenziellen *Targeting* zwischen pathologischen und gesunden Zellen unterscheiden. Es ergibt sich ein neues therapeutisches Fenster, welches die *on target, off tumor*-Toxizität deutlich verringert. Im Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassay mit Nalm-6 und gesunden B-Zellen in Kokultur konnte gezeigt werden, dass die kombinierte LLE-mAb-Therapie von LLE-CD19 mAb, LLE-CD10 mAb und LLE-CD138 mAb zu einer Lyse von Nalm-6 (40 % Lyse) bei gleichzeitiger Aussparung der gesunden B-Zellen (1 % Lyse) führt (siehe Kapitel 3.5.2.3 Differenzielles *Targeting*). Höhere Konzentrationen von LLE-CD19 mAb

fürten jedoch auch zur verstärkten Lyse von gesunden B-Zellen (siehe Kapitel 3.5.2.2). Die *on target, off tumor*-Toxizität bei einzelner LLE-mAb-Therapie in höherer Konzentration kann durch differenzielles und multiples *Targeting* verringert (siehe Abbildung 4.2) oder zumindest zeitlich begrenzt werden [176]. Für das kombinatorische, differenzielle *Targeting* sollten Zielantigene (A, B, C) ausgewählt werden, die in dieser Kombination (A + B + C) für die Tumorzellen spezifisch sind (siehe Abbildung 4.2). Beim *Targeting* dieser Zielantigene mit jeweils subtherapeutischen Antikörperkonzentrationen ist es daher irrelevant, dass andere gesunde Körperzellen einzelne dieser Zielantigene (A, B oder C) exprimieren. Nur die LLE-mAb in Kombination auf den Tumorzellen überschreiten den Schwellenwert zur Aktivierung der AdCAR-T-Zellen und induzieren die Lyse der Tumorzellen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung der SAM eine selektive Lyse von pathologischen Zellen unter Aussparung von gesunden Zellen, die teilweise die gleichen Antigene besitzen, möglich ist.

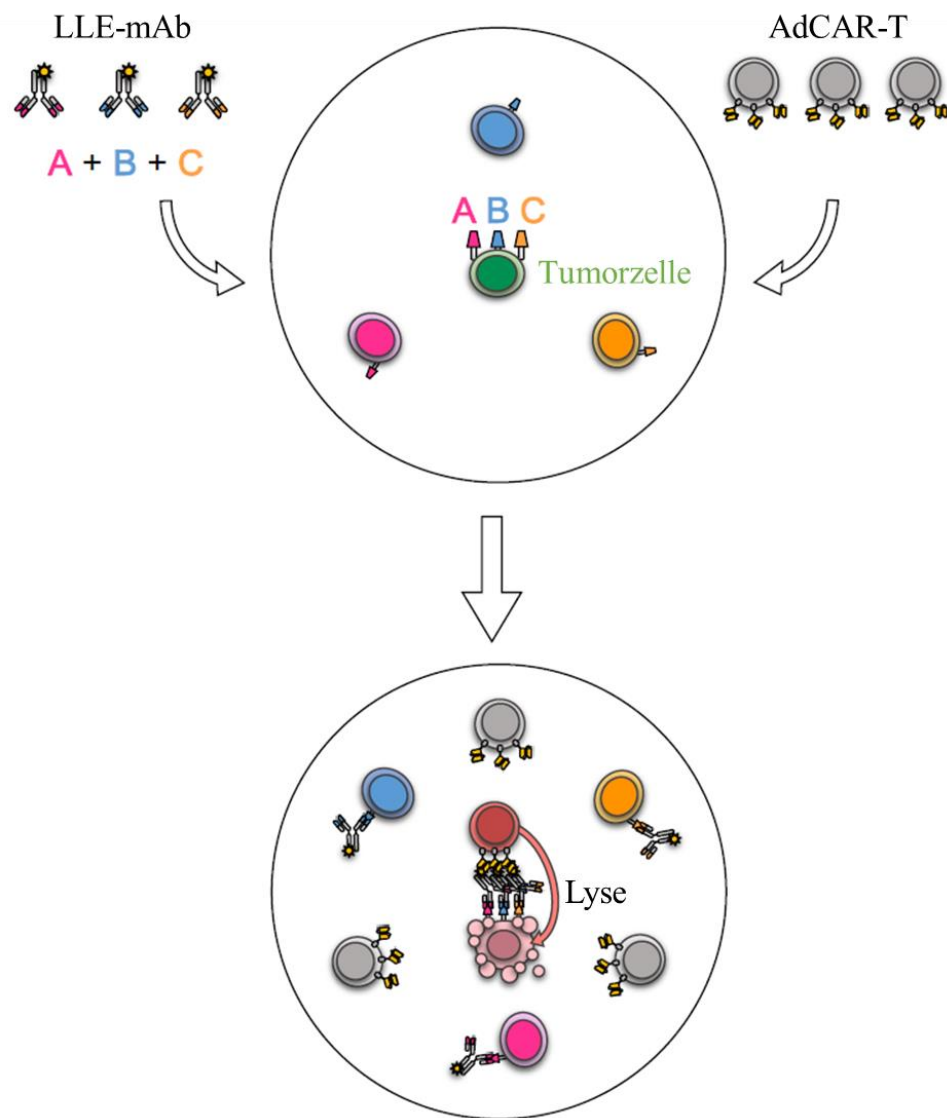


Abbildung 4.2: Selektive Tumorlyse durch differenzielles Targeting mittels SAM

Die inaktivierte AdCAR-T-Zelle ist grau und die aktivierte rot illustriert. Die Tumorzelle (grün) exprimiert die Antigene A, B und C. Die Antigene werden jeweils auch von anderen gesunden Zellen (blau, pink und gelb) exprimiert, aber in diesem Beispiel nicht in der Kombination A + B + C. Die biotinylierten monoklonalen Antikörper (LLE-mAb) binden an die entsprechenden Antigene der Target-Zellen. Die AdCAR-T-Zellen-vermittelte Induktion der Tumorlyse (rosa) erfolgt durch synchrones multiples *Targeting*, wenn die Schwellenwertkonzentration der LLE-mAb überschritten wird. Bei den gesunden Zellen bleibt die Konzentration der LLE-mAb unterschwellig, sodass keine Aktivierung der AdCAR-T-Zellen stattfindet.

(Adaptiert aus [168])

4.7 Diskussion der Methodik

4.7.1 Antigenexpression

Die Immunphänotypisierung der Tumorzelllinien erfolgte mittels Sekundärfärbung und anschließender FC-Messung (Ergebnisse siehe Kapitel 3.2). Für die Färbung (Primärantikörper) und die späteren Zytotoxizitätsassays wurden die gleichen LLE-mAb verwendet. Die Ergebnisse ließen daher auch Rückschlüsse auf die Effizienz der eingesetzten biotinylierten Antikörper als AM im AdCAR-T-Zell-System zu. Neben dem Antigennachweis erfolgte eine Kontrolle der Bindung des jeweiligen LLE-mAb an das Epitop der Zelloberfläche. Der Sekundärantikörper und der AdCAR binden an eine analoge Bindungsdomäne. Dadurch wurde auch die Bindung der AdCAR-T-Zellen über das AM an der Zelloberfläche untersucht.

4.7.2 Bewertung der Lyse

Die Stimulation und Zellpflege der AdCAR-T-Zellen mit Zytokinen erschwerten die Interpretation der induzierten Lyse durch eine hohe Spontanaktivität der T-Zellen. 72 Stunden vor den Zytotoxizitätsassays erfolgte daher eine Kultivierung der AdCAR-T-Zellen in zytokinfreiem Medium. Es handelt sich hierbei um ein bekanntes, physiologisches Phänomen. Xu *et al.* bestätigten einen IL-2- und IL-15-abhängigen Anstieg der zytolytischen Aktivität von CAR-T-Zellen *in vitro* [223].

Die AdCAR-T-Zellen waren zwischen Tag 10 und 20 nach Expansionsbeginn vergleichbar vital und einsetzbar. Dennoch variierte ihre Aktivität in diesem Zeitraum, sodass für die Experimente einer Zelllinie möglichst gleich alte AdCAR-T-Zellen verwendet wurden. Ältere oder aufgetaute AdCAR-T-Zellen induzierten meist eine geringere Lyse als frisch hergestellte AdCAR-T-Zellen, eliminierten jedoch weiterhin spezifisch Zielantigen-positive Target-Zellen. Die E:T-Titration wurde meist mit AdCAR-T-Zellen zu Beginn ihrer Verwendbarkeit (an Tag 10) durchgeführt, sodass dies eine Ursache dafür sein könnte, dass die Tumorlyse durch den biotinylierten Kontrollantikörper hoch war (beispielsweise bei LS, siehe Abbildung 3.14).

Des Weiteren variierte die LNGFR-/AdCAR-Expression je nach blutspendender Person und Viruscharge der AdCAR-T-Zell-Expansionen (siehe Kapitel 3.3).

Die Transduzierbarkeit der T-Zellen variierte zwischen den Donoren. Die LNGFR-/AdCAR-Expression von D6 war überdurchschnittlich häufig $< 50\%$. Möglicherweise könnte die AdCAR-T-Zell-Herstellung daher nicht bei jeder erkrankten Person in gleichem Maße gelingen.

Für die Experimente wurden nur AdCAR-T-Zellen mit einer AdCAR-Expression $> 50\%$ sowie mit einer ausgeglichenen Verteilung der Oberflächenantigene CD8 und CD4 für spätere Zytotoxizitätsassays verwendet. Die verwendete Anzahl der Effektor-Zellen wurde entsprechend der LNGFR-Expression normalisiert. Dadurch variierte jedoch die eingesetzte Zellzahl in den *Wells* geringfügig. Aus diesem Grund wurde eine positive Isolierung der AdCAR-T-Zellen mittels LNGFR-MACS durchgeführt. Die AdCAR-T-Zellen waren danach allerdings nicht mehr aktiv und gingen häufig in Apoptose.

Zusätzlich dazu wurden möglichst niedrige E:T-Verhältnisse verwendet, bei denen die spezifische Tumorlyse hoch ($> 50\%$) und die unspezifische Tumorlyse durch den Kontrollantikörper möglichst niedrig war. Trotzdem war eine unspezifische Tumorlyse durch den Kontrollantikörper messbar. Kontrollen sind daher unbedingt notwendig, um die T-Zell-Aktivierung und die Tumorlyse bewerten zu können. Andere Forschungsgruppen mit CAR-T-Zell-Adaptersystemen verwendeten oft höhere E:T-Verhältnisse von 10:1 mit einer kürzeren Inkubationszeit von 24 Stunden [176, 196]. Eine maximale Tumorlyse von durchschnittlich 100% wurde in den LCA nach 48 Stunden mit LLE-mAb erreicht, die bei der jeweiligen Tumorzelllinie als gute AM für die AdCAR-T-Zellen angesehen werden können. Dies ermöglicht *in vitro* eine Beobachtung und Bewertung der Tumorlyse im Zeitverlauf und bestätigt eine effiziente Wirkung des CAR-T-Zell-Adaptersystems [148, 168, 169, 176, 177, 195-197].

Ein weiteres Problem der Vergleichbarkeit zwischen spezifischer und unspezifischer Lyse durch den verwendeten REA Control Kontrollantikörper stellt dessen vielfache Biotinylierung dar. Sie unterscheidet sich teilweise von derjenigen der verwendeten LLE-mAb und kann damit die unspezifische Lyse erhöhen.

Ein längerer Zytokinentzug, eine längere Beobachtung, die Verwendung von einheitlich biotinylierten und monobiotinylierten LLE-mAb und ein niedrigeres E:T-Verhältnis könnten die unspezifischen Effekte weiter reduzieren. Die Beobachtungslänge war durch die Wellgröße in den Zytotoxizitätsassays auf maximal 48 bzw. 72 Stunden beschränkt.

Danach nahm die Vitalität der Zellen durch Nährstoffmangel ab. Eine Farbänderung des Zellmediums von rot nach gelb wies auf eine Erniedrigung des pH-Wertes hin. Ein Wechsel des Mediums nach Beginn der Inkubationszeit war technisch nicht möglich.

4.7.3 Übertragung auf die klinische Anwendung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit AdCAR-T-Zellen bei fluiden und soliden Tumorerkrankungen flexibel, kontrollierbar und effizient ist. Außerdem kann die Toxizität auf gesunde Zellen durch geeignetes kombinatorisches *Targeting* reduziert werden. Der experimentelle Einsatz des CAR-T-Zell-Adaptersystems *in vivo* im Mausmodell erfolgt bereits und ist sehr vielversprechend [148, 168, 169, 176, 177, 195-197]. Die erste klinische, multizentrische Studie mit anderen CAR-T-Adapterzellen (UniCAR-T-Zellen) bei CD123-positiven, hämatologischen und lymphatischen Malignomen ist momentan (Stand Dezember 2020) in Durchführung (NCT04230265).

Die unterschiedlichen Antigenexpressionen der Zelllinien lassen grobe Vermutungen über die durch die unterschiedlichen LLE-mAb induzierte Tumorlyse zu. Die Effizienz der AdCAR-T-Zellen müsste vor einer klinischen Anwendung dennoch getestet werden, da sich die Tumorzellen unterschiedlich gut durch AdCAR-T-Zellen lysieren ließen.

4.8 Ausblick: AdCAR-T-Zell-Therapie in Kombination mit anderen Therapien

Die AdCAR-T-Zell-Therapie besitzt als individualisierte Immuntherapie mit den Möglichkeiten des multiplen, sequenziellen und differenziellen *Targetings* ein großes klinisches Potenzial [168].

Inwieweit ein präklinisches Antigen Screening für jede erkrankte Person praktisch und finanziell umsetzbar wäre, bleibt fragwürdig. Ziel wäre ein universell anwendbares Medikament auf der Basis der SAM. Zusätzlich könnte die AdCAR-T-Zell-Therapie im Rahmen einer SPIIT jederzeit flexibel und individuell neu angepasst werden, was in Anbetracht der Heterogenität von Tumorerkrankungen von Vorteil und großer Relevanz wäre.

Letztendlich muss an weiteren Möglichkeiten zur Reduktion der Neurotoxizität, des CRS und der *on target, off tumor*-Toxizität auf gesunde Körperzellen geforscht werden [197].

Die Effizienz der AdCAR-T-Zell-Therapie kann durch Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie, Chirurgie oder weiteren Therapiestrategien erhöht werden, um die Heilungsrate zu optimieren. Bei Letzterem gibt es vielfältige mögliche Ansatzpunkte wie beispielsweise die Neoangiogenese des Tumors über VEGF und *chemokine stromal-derived factor* (CXCL12) [224], eine Impfung gegen Neoantigene des Tumors [225], onkolytische Viren [226], die Stimulation der T-Zellen durch Aktivierung von Signalwegen der TNF-Familie [227], die Stimulation des angeborenen Immunsystems über Interferon (IFN)-I und -II [228] oder die Manipulation des immunsuppressiven Tumor-Mikroumfelds [229].

Eine Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren (wie beispielsweise Anti-PD-1- oder Anti-PD-L1-Antikörper) vor oder während der AdCAR-T-Zell-Therapie könnte den AdCAR-T-Zelltransport zum Tumor, deren Effektorfunktion und Überleben verbessern. Im präklinischen Modell konnte dadurch die Zielantigen-spezifische Tumorlyse erhöht werden. Dies könnte schlussendlich zur Eindämmung und vollständigen Elimination der Tumorzellen führen [186, 188].

Zusammenfassend konnte sowohl im synchronen als auch im sequenziellen und differenziellen *Targeting* die Effizienz, Steuerbarkeit und universelle Anwendbarkeit der AdCAR-T-Zell-Therapie gezeigt werden. Das AdCAR-T-Zell-System stellt eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen CAR-T-Zell-Therapie dar und wird diese auf verschiedene solide Tumorentitäten ausdehnen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Flexibilität, Steuerbarkeit, Effektivität und Selektivität der AdCAR-T-Zell-Therapie exemplarisch bei fluiden (BCP-ALL, B-NHL) und soliden Tumoren (Neuroblastom und Mammakarzinom) *in vitro* gezeigt. Als zentrales Element wurde die *Surface Activation Matrix* als neues immuntherapeutisches Prinzip bei kombinatorischem *Targeting* untersucht. AdCAR-T-Zellen sind in der Lage, Antigen und LLE-mAb-spezifisch Target-Zellen zu lysieren. Die Aktivität der AdCAR-T-Zellen ist durch die Zugabe der LLE-mAb an- und ausschaltbar. Entsprechend des SAM-Modells ist zur Induktion der Zielantigen-abhängigen Lyse das Überschreiten einer Schwellenwertkonzentration von LLE-mAb nötig. Unterhalb dieser Konzentration wurde beim einzelnen *Targeting* keine spezifische Lyse erzielt. Durch multiples, synchrones *Targeting* mit jeweils subtherapeutischen LLE-mAb-Konzentrationen konnte bei allen Tumorzelllinien eine hohe additive Tumorlyse erreicht werden.

Mit JeKo-1 Wildtyp- und Knockout-Varianten wurde die Situation eines Antigenverlustes von Tumorzellen simuliert. AdCAR-T-Zellen lysierten spezifisch und zeitlich flexibel Zielantigen-positive Target-Zellen. Die AM können jederzeit flexibel angepasst werden. Durch zeitlich versetztes, sequenzielles *Targeting* kann Therapieversagen durch Immunevasion des Tumors vermieden werden.

Das Prinzip des differenziellen *Targetings* wurde mit Nalm-6 Tumorzellen und gesunden B-Zellen in Kokultur untersucht. Entsprechend des SAM-Modells führte nur die Expression der Gesamtheit der Zielantigene beim *Targeting* mit subtherapeutischen LLE-mAb-Konzentrationen zu einer Aktivierung der AdCAR-T-Zellen. Es ist daher irrelevant, dass andere gesunde Körperzellen und lebenswichtige Gewebe einzelne der Zielantigene exprimieren, wenn diese jeweils lediglich mit subtherapeutischen LLE-mAb-Konzentrationen adressiert werden.

Die Anwendung der SAM sowie das sequenzielle und differenzielle kombinatorische *Targeting* von tumorspezifischen Antigenen ermöglichen eine AdCAR-T-Zellen-induzierte zielgerichtete Tumorlyse bei gleichzeitig verringerter oder zumindest zeitlich begrenzter *on target, off tumor*-Toxizität. Dadurch können potenziell lebensbedrohliche akute und chronische Nebenwirkungen der Tumortherapie kontrolliert und reduziert werden. Zusammenfassend stellt das AdCAR-T-Zell-System eine effiziente, sichere und universelle Therapiestrategie bei heterogenen soliden und fluiden Tumorzelllinien dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Fitzmaurice C, Akinyemiju T F, Al Lami F H, Alam T, Alizadeh-Navaei R, Allen C, Alsharif U, Alvis-Guzman N, Amini E, et al. (2018) Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 4(11):1553-1568.
2. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G (2019) Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience.* 13:961-961.
3. Schirmacher V (2019) From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 54(2):407-419.
4. Straub J M, New J, Hamilton C D, Lominska C, Shnyder Y, Thomas S M (2015) Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141(11):1985-1994.
5. Heron D E, Shogan J E, Mucenski J W (2008) Innovations in chemotherapy and radiation therapy: Implications and opportunities for the Asia-Pacific Rim. *Biomed Imaging Interv J.* 4(3):e40-e40.
6. Wang Y, Probin V, Zhou D (2006) Cancer therapy-induced residual bone marrow injury- Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev.* 2(3):271-279.
7. Testa N G, Hendry J H, Molineux G (1985) Long-term bone marrow damage in experimental systems and in patients after radiation or chemotherapy. *Anticancer Res.* 5(1):101-110.
8. Dagogo-Jack I, Shaw A T (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 15(2):81-94.
9. Weiner L M, Surana R, Wang S (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 10(5):317-327.
10. Chen J, Jaracz S, Zhao X, Chen S, Ojima I (2005) Antibody-cytotoxic agent conjugates for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2(5):873-890.
11. Sharkey R M, Behr T M, Mattes M J, Stein R, Griffiths G L, Shih L B, Hansen H J, Blumenthal R D, Dunn R M, Juweid M E, et al. (1997) Advantage of residualizing radiolabels for an internalizing antibody against the B-cell lymphoma antigen, CD22. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 44(3):179-188.
12. Yang R K, Sondel P M (2010) Anti-GD2 Strategy in the Treatment of Neuroblastoma. *Drugs Future.* 35(8):665.
13. Horton H M, Bernett M J, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu S Y, Richards J O, Vostiar I, Joyce P F, Repp R, et al. (2008) Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer research.* 68(19):8049-8057.
14. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle P A, Bargou R (2012) Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacology & therapeutics.* 136(3):334-342.
15. Real P, Benito A, Cuevas J, Berciano M, Juan A, Coffey P, Gómez-Román J, Lafarga M, Lopez-vega j, Fernández-Luna J (2005) Blockade of Epidermal Growth Factor Receptors Chemosensitizes Breast Cancer Cells through Up-Regulation of Bnip3L. *Cancer research.* 65:8151-8157.

16. Strati P, Shanafelt T D (2015) Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*. 126(4):454-462.
17. Terwilliger T, Abdul-Hay M (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 7(6):e577-e577.
18. Hunger S P, Lu X, Devidas M, Camitta B M, Gaynon P S, Winick N J, Reaman G H, Carroll W L (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30(14):1663-1669.
19. Perry A M, Diebold J, Nathwani B N, MacLennan K A, Müller-Hermelink H K, Bast M, Boilesen E, Armitage J O, Weisenburger D D (2016) Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 101(10):1244-1250.
20. Cohen J B, Zain J M, Kahl B S (2017) Current Approaches to Mantle Cell Lymphoma: Diagnosis, Prognosis, and Therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 37:512-525.
21. Gianni A M, Magni M, Martelli M, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Pilotti S, Rambaldi A, Cortelazzo S, Patti C, Parvis G, et al. (2003) Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood*. 102(2):749-755.
22. David R, Lamki N, Fan S, Singleton E B, Eftekhari F, Shirkhoda A, Kumar R, Madewell J E (1989) The many faces of neuroblastoma. *Radiographics*. 9(5):859-882.
23. Knudson A G, Jr., Strong L C (1972) Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet*. 24(5):514-532.
24. London W B, Castleberry R P, Matthay K K, Look A T, Seeger R C, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris J M, Reynolds C P, et al. (2005) Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23(27):6459-6465.
25. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M J (2007) Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians*. 57(1):43-66.
26. Hudecek M, Schmitt T M, Baskar S, Lupo-Stanghellini M T, Nishida T, Yamamoto T N, Bleakley M, Turtle C J, Chang W C, Greisman H A, et al. (2010) The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 116(22):4532-4541.
27. Eisemann N, Waldmann A, Katalinic A (2013) Epidemiology of Breast Cancer - Current Figures and Trends. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 73(2):130-135.
28. Rosner B, Colditz G A, Willett W C (1994) Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 139(8):819-835.
29. Ford D, Easton D F, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop D T, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, et al. (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and

- BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 62(3):676-689.
30. King M C, Marks J H, Mandell J B (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 302(5645):643-646.
 31. Lahmann P H, Hoffmann K, Allen N, van Gils C H, Khaw K T, Tehard B, Berrino F, Tjonneland A, Bigaard J, Olsen A, et al. (2004) Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 111(5):762-771.
 32. Wang K, Wei G, Liu D (2012) CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 1(1):36.
 33. Dorken B, Moldenhauer G, Pezzutto A, Schwartz R, Feller A, Kiesel S, Nadler L M (1986) HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 136(12):4470-4479.
 34. Campana D, Janossy G, Bofill M, Trejdosiewicz L K, Ma D, Hoffbrand A V, Mason D Y, Lebacqz A M, Forster H K (1985) Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 134(3):1524-1530.
 35. Leduc I, Preud'homme J L, Cogne M (1992) Structure and expression of the mb-1 transcript in human lymphoid cells. *Clinical and experimental immunology.* 90(1):141-146.
 36. Schwartz-Albiez R, Dorken B, Hofmann W, Moldenhauer G (1988) The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 140(3):905-914.
 37. Knobloch K P, Wright M D, Ochsenbein A F, Liesenfeld O, Lohler J, Zinkernagel R M, Horak I, Orinska Z (2000) Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol Cell Biol.* 20(15):5363-5369.
 38. Mishra D, Singh S, Narayan G (2016) Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis. *Mol Biol Int.* 2016:4328697.
 39. Tung J W, Mrazek M D, Yang Y, Herzenberg L A, Herzenberg L A (2006) Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(16):6293-6298.
 40. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F (2019) The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol.* 10(721).
 41. Fujimoto M, Poe J C, Inaoki M, Tedder T F (1998) CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Seminars in immunology.* 10(4):267-277.
 42. Poe J C, Minard-Colin V, Kountikov E I, Haas K M, Tedder T F (2012) A c-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 189(5):2318-2325.
 43. Mills D M, Stolpa J C, Cambier J C (2007) Modulation of MHC class II signal transduction by CD19. *Adv Exp Med Biol.* 596:139-148.

44. Chung E Y, Psathas J N, Yu D, Li Y, Weiss M J, Thomas-Tikhonenko A (2012) CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *The Journal of clinical investigation*. 122(6):2257-2266.
45. Erdos E G, Skidgel R A (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 3(2):145-151.
46. van Zelm M C, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel C J, van Tol M J, Woellner C, Grimbacher B, Patino P J, van Dongen J J, et al. (2006) An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England journal of medicine*. 354(18):1901-1912.
47. Jang T J, Park J B, Lee J I (2013) The Expression of CD10 and CD15 Is Progressively Increased during Colorectal Cancer Development. *J Pathol Transl Med*. 47(4):340-347.
48. Lee K W, Sung C O, Kim J H, Kang M, Yoo H Y, Kim H H, Um S H, Kim S H (2015) CD10 expression is enhanced by Twist1 and associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma with facilitating tumorigenicity in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 136(2):310-321.
49. Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *The Journal of cell biology*. 108(4):1547-1556.
50. Kind S, Merenkow C, Buscheck F, Moller K, Dum D, Chirico V, Luebke A M, Hoflmayer D, Hinsch A, Jacobsen F, et al. (2019) Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Dis Markers*. 2019:4928315.
51. Stepp M A, Gibson H E, Gala P H, Iglesia D D, Pajooohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz A M, Goldberger O, et al. (2002) Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *Journal of cell science*. 115(Pt 23):4517-4531.
52. Koda J E, Rapraeger A, Bernfield M (1985) Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *The Journal of biological chemistry*. 260(13):8157-8162.
53. Freissler E, Meyer auf der Heyde A, David G, Meyer T F, Dehio C (2000) Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2(1):69-82.
54. Stewart M D, Ramani V C, Sanderson R D (2015) Shed syndecan-1 translocates to the nucleus of cells delivering growth factors and inhibiting histone acetylation: a novel mechanism of tumor-host cross-talk. *The Journal of biological chemistry*. 290(2):941-949.
55. McCarron M J, Park P W, Fooksman D R (2017) CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood*. 129(20):2749-2759.
56. Schwartz-Albiez R, Dorken B, Monner D A, Moldenhauer G (1991) CD22 antigen: biosynthesis, glycosylation and surface expression of a B lymphocyte protein involved in B cell activation and adhesion. *International immunology*. 3(7):623-633.
57. Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, et al. (2013) Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 121(7):1165-1174.

58. Nitschke L (2009) CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunol Rev.* 230(1):128-143.
59. Stamenkovic I, Seed B (1990) The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. *Nature.* 345(6270):74-77.
60. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy M S, Anderson T (1991) The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell.* 66(6):1133-1144.
61. Engel P, Nojima Y, Rothstein D, Zhou L J, Wilson G L, Kehrl J H, Tedder T F (1993) The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 150(11):4719-4732.
62. Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro J E, Widhopf G F, 2nd, Rassenti L Z, Cantwell M J, Prussak C E, et al. (2008) Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8):3047-3052.
63. Valentine M A, Meier K E, Rossie S, Clark E A (1989) Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry.* 264(19):11282-11287.
64. Kumar J, Khan A A, Saraf A, Bhargava M (2014) Expression of CD20 in B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 30(1):16-18.
65. Dworzak M N, Fritsch G, Froschl G, Printz D, Gadner H (1998) Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood.* 92(9):3203-3209.
66. Patterson H C, Kraus M, Wang D, Shahsafaei A, Henderson J M, Seagal J, Otipoby K L, Thai T H, Rajewsky K (2011) Cytoplasmic Ig alpha serine/threonines fine-tune Ig alpha tyrosine phosphorylation and limit bone marrow plasma cell formation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 187(6):2853-2858.
67. Luger D, Yang Y A, Raviv A, Weinberg D, Banerjee S, Lee M J, Trepel J, Yang L, Wakefield L M (2013) Expression of the B-cell receptor component CD79a on immature myeloid cells contributes to their tumor promoting effects. *PLoS One.* 8(10):e76115.
68. Monroe J G (2006) ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol.* 6(4):283-294.
69. Healy J I, Goodnow C C (1998) Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annual review of immunology.* 16:645-670.
70. Kraus M, Pao L I, Reichlin A, Hu Y, Canono B, Cambier J C, Nussenzweig M C, Rajewsky K (2001) Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail. *J Exp Med.* 194(4):455-469.

71. Xu-Monette Z Y, Li L, Byrd J C, Jabbar K J, Manyam G C, Maria de Winde C, van den Brand M, Tzankov A, Visco C, Wang J, et al. (2016) Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 128(26):3083-3100.
72. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Mansson J E, Rynmark B M (1994) Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochimica et biophysica acta*. 1214(2):115-123.
73. Cheung N K, Saarinen U M, Neely J E, Landmeier B, Donovan D, Coccia P F (1985) Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer research*. 45(6):2642-2649.
74. Schulz G, Cheresch D A, Varki N M, Yu A, Staffileno L K, Reisfeld R A (1984) Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer research*. 44(12 Pt 1):5914-5920.
75. Siebert N, Eger C, Seidel D, Jüttner M, Zumpe M, Wegner D, Kietz S, Ehlert K, Veal G J, Siegmund W, et al. (2016) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ch14.18/CHO in relapsed/refractory high-risk neuroblastoma patients treated by long-term infusion in combination with IL-2. *MAbs*. 8(3):604-616.
76. Yu A L, Uttenreuther-Fischer M M, Huang C S, Tsui C C, Gillies S D, Reisfeld R A, Kung F H (1998) Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 16(6):2169-2180.
77. Xiao W H, Yu A L, Sorkin L S (1997) Electrophysiological characteristics of primary afferent fibers after systemic administration of anti-GD2 ganglioside antibody. *Pain*. 69(1-2):145-151.
78. Yuki N, Yamada M, Tagawa Y, Takahashi H, Handa S (1997) Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy. *Journal of the neurological sciences*. 149(2):127-130.
79. Perez Horta Z, Goldberg J L, Sondel P M (2016) Anti-GD2 mAbs and next-generation mAb-based agents for cancer therapy. *Immunotherapy*. 8(9):1097-1117.
80. Picarda E, Ohaegbulam K C, Zang X (2016) Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 22(14):3425-3431.
81. Liu F, Zhang T, Zou S, Jiang B, Hua D (2015) B7H3 promotes cell migration and invasion through the Jak2/Stat3/MMP9 signaling pathway in colorectal cancer. *Molecular medicine reports*. 12(4):5455-5460.
82. Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa A R, Negri F, Conte R, Corrias M V, Moretta L, et al. (2004) Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(34):12640-12645.
83. Prasad D V R, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, Dong C (2004) Murine B7-H3 Is a Negative Regulator of T Cells. *The Journal of Immunology*. 173(4):2500-2506.
84. Suh W-K, Wang S X, Jheon A H, Moreno L, Yoshinaga S K, Ganss B, Sodek J, Grynpas M D, Mak T W (2004) The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation and bone

- mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(35):12969-12973.
85. Chen Y W, Tekle C, Fodstad O (2008) The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. *Current cancer drug targets*. 8(5):404-413.
 86. Brummendorf T, Kenwrick S, Rathjen F G (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Current opinion in neurobiology*. 8(1):87-97.
 87. Lindner J, Rathjen F G, Schachner M (1983) L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*. 305(5933):427-430.
 88. Martini R, Schachner M (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *The Journal of cell biology*. 103(6 Pt 1):2439-2448.
 89. Cohen N R, Taylor J S, Scott L B, Guillery R W, Soriano P, Furley A J (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Current biology : CB*. 8(1):26-33.
 90. Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems P J (1997) L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Human molecular genetics*. 6(10):1625-1632.
 91. Debiec H, Christensen E I, Ronco P M (1998) The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 143(7):2067-2079.
 92. Pancook J D, Reisfeld R A, Varki N, Vitiello A, Fox R I, Montgomery A M (1997) Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 158(9):4413-4421.
 93. Inaguma S, Wang Z, Lasota J P, Miettinen M M (2016) Expression of neural cell adhesion molecule L1 (CD171) in neuroectodermal and other tumors: An immunohistochemical study of 5155 tumors and critical evaluation of CD171 prognostic value in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*. 7(34):55276-55289.
 94. Wachowiak R, Fiegel H C, Kaifi J T, Quaas A, Krickhahn A, Schurr P G, Erttmann R, Schachner M, Kluth D, Sauter G, et al. (2007) L1 is associated with favorable outcome in neuroblastomas in contrast to adult tumors. *Ann Surg Oncol*. 14(12):3575-3580.
 95. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*. 10(8):4007-4015.
 96. Ashman L K (1999) The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 31(10):1037-1051.
 97. Kostoula V, Khan K, Savage K, Stubbs M, Quaglia A, Dhillon A P, Hochhauser D, Caplin M E (2005) Expression of c-kit (CD117) in neuroendocrine tumours--a target for therapy? *Oncology reports*. 13(4):643-647.

98. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current biology* : CB. 8(13):779-782.
99. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri H Z, Ahmadipour F (2016) Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 10:2443-2459.
100. Paronetto M P, Farini D, Sammarco I, Maturo G, Vespasiani G, Geremia R, Rossi P, Sette C (2004) Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *Am J Pathol.* 164(4):1243-1251.
101. Cardoso H J, Figueira M I, Socorro S (2017) The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer. *J Cell Commun Signal.* 11(4):297-307.
102. Oliveira S H, Lukacs N W (2003) Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. *Current drug targets Inflammation and allergy.* 2(4):313-318.
103. Kissel H, Timokhina I, Hardy M P, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, Angeles M, Whitlow S R, Manova K, Besmer P (2000) Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *The EMBO journal.* 19(6):1312-1326.
104. Mackenzie M A, Jordan S A, Budd P S, Jackson I J (1997) Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Developmental biology.* 192(1):99-107.
105. Scott G, Ewing J, Ryan D, Abboud C (1994) Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions. *Pigment cell research.* 7(1):44-51.
106. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield J H, Ashman L K, Kanayama Y, et al. (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *The Journal of clinical investigation.* 92(4):1736-1744.
107. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi G N, Ueno N T (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 136(2):331-345.
108. Baselga J, Albanell J (2002) Epithelial growth factor receptor interacting agents. *Hematology/oncology clinics of North America.* 16(5):1041-1063.
109. Yarden Y, Sliwkowski M X (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2(2):127-137.
110. Ferrara N, Kerbel R S (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 438(7070):967-974.
111. Grandis J R, Sok J C (2004) Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & therapeutics.* 102(1):37-46.
112. Brown E J, Frazier W A (2001) Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in cell biology.* 11(3):130-135.
113. Oldenborg P A, Gresham H D, Chen Y, Izui S, Lindberg F P (2002) Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood.* 99(10):3500-3504.

114. Olsson M, Bruhns P, Frazier W A, Ravetch J V, Oldenborg P A (2005) Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood*. 105(9):3577-3582.
115. Jaiswal S, Jamieson C H, Pang W W, Park C Y, Chao M P, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman I L (2009) CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 138(2):271-285.
116. Majeti R, Chao M P, Alizadeh A A, Pang W W, Jaiswal S, Gibbs K D, Jr., van Rooijen N, Weissman I L (2009) CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 138(2):286-299.
117. Chao M P, Alizadeh A A, Tang C, Myklebust J H, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha A C, Chan C K, Tan B T, et al. (2010) Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*. 142(5):699-713.
118. Chan K S, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J, Jr., Chang H Y, van de Rijn M, et al. (2009) Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(33):14016-14021.
119. Willingham S B, Volkmer J P, Gentles A J, Sahoo D, Dalerba P, Mitra S S, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen J D, et al. (2012) The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(17):6662-6667.
120. Zinkernagel R M (1997) The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Scand J Immunol*. 46(5):421-436.
121. Andersen M H, Schrama D, thor Straten P, Becker J C (2006) Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 126(1):32-41.
122. Liu Q J, Gao B (2008) Manipulation of MHC-I/TCR interaction for immune therapy. *Cell Mol Immunol*. 5(3):171-182.
123. Bubenik J (2004) MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int J Oncol*. 25(2):487-491.
124. Gross G, Waks T, Eshhar Z (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(24):10024-10028.
125. Irving B A, Weiss A (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*. 64(5):891-901.
126. Abram C L, Lowell C A (2007) The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Sci STKE*. 2007(377):re2.
127. Rezvani K, Rouce R H (2015) The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. *Front Immunol*. 6:578-578.

128. Fry T J, Shah N N, Orentas R J, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Ramakrishna S, Wolters P, Martin S, Delbrook C, Yates B, et al. (2018) CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med.* 24(1):20-28.
129. Lee D W, Kochenderfer J N, Stetler-Stevenson M, Cui Y K, Delbrook C, Feldman S A, Fry T J, Orentas R, Sabatino M, Shah N N, et al. (2015) T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet.* 385(9967):517-528.
130. Park J H, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran K J, Sauter C, Wang Y, Santomaso B, Mead E, et al. (2018) Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine.* 378(5):449-459.
131. Turtle C J, Hanafi L-A, Berger C, Gooley T A, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto T M, et al. (2016) CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of clinical investigation.* 126(6):2123-2138.
132. Maude S L, Frey N, Shaw P A, Aplenc R, Barrett D M, Bunin N J, Chew A, Gonzalez V E, Zheng Z, Lacey S F, et al. (2014) Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 371(16):1507-1517.
133. Kochenderfer J N, Dudley M E, Kassim S H, Somerville R P T, Carpenter R O, Stetler-Stevenson M, Yang J C, Phan G Q, Hughes M S, Sherry R M, et al. (2015) Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 33(6):540-549.
134. Neelapu S S, Locke F L, Bartlett N L, Lekakis L J, Miklos D B, Jacobson C A, Braunschweig I, Oluwole O O, Siddiqi T, Lin Y, et al. (2017) Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine.* 377(26):2531-2544.
135. Turtle C J, Hanafi L-A, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, Hawkins R, Chaney C, Cherian S, Chen X, et al. (2016) Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med.* 8(355):355ra116-355ra116.
136. Maude S L, Laetsch T W, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris M R, Stefanski H E, Myers G D, et al. (2018) Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 378(5):439-448.
137. Mueller K T, Maude S L, Porter D L, Frey N, Wood P, Han X, Waldron E, Chakraborty A, Awasthi R, Levine B L, et al. (2017) Cellular kinetics of CTL019 in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 130(21):2317-2325.
138. Gauthier J, Turtle C J (2018) Insights into cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19-specific CAR-T cell therapy. *Curr Res Transl Med.* 66(2):50-52.
139. Lee D W, Gardner R, Porter D L, Louis C U, Ahmed N, Jensen M, Grupp S A, Mackall C L (2014) Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 124(2):188-195.

140. Mackall C L, Miklos D B (2017) CNS Endothelial Cell Activation Emerges as a Driver of CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Cancer Discov.* 7(12):1371-1373.
141. Fried S, Avidgor A, Bielorai B, Meir A, Besser M J, Schachter J, Shimoni A, Nagler A, Toren A, Jacoby E (2019) Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant.* 54(10):1643-1650.
142. Ma F, Ho J-Y, Du H, Xuan F, Wu X, Wang Q, Wang L, Liu Y, Ba M, Wang Y, et al. (2019) 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.* 37(5):601-608.
143. Wherry E J (2011) T cell exhaustion. *Nature immunology.* 12(6):492-499.
144. Sotillo E, Barrett D M, Black K L, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, Sussman R, Lanauze C, Ruella M, Gazzara M R, et al. (2015) Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov.* 5(12):1282-1295.
145. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi L A, Finney O, Smithers H, Jensen M C, Riddell S R, Maloney D G, et al. (2016) Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood.* 127(20):2406-2410.
146. Shalabi H, Kraft I L, Wang H W, Yuan C M, Yates B, Delbrook C, Zimelman J D, Giller R, Stetler-Stevenson M, Jaffe E S, et al. (2018) Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 103(5):e215-e218.
147. Ruella M, Maus M V (2016) Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J.* 14:357-362.
148. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, Davila E (2012) Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 18(23):6436-6445.
149. Hurwitz R, Hozier J, Lebien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J (1979) Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *International Journal of Cancer.* 23(2):174-180.
150. Jeon H J, Kim C W, Yoshino T, Akagi T (1998) Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *British Journal of Haematology.* 102(5):1323-1326.
151. Angelisova P, Hilgert I, Horejsi V (1994) Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics.* 39(4):249-256.
152. Rudolph G, Schilbach-Stückle K, Handgretinger R, Kaiser P, Hameister H (1991) Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Human Genetics.* 86(6):562-566.
153. Hackett A J, Smith H S, Springer E L, Owens R B, Nelson-Rees W A, Riggs J L, Gardner M B (1977) Two Syngeneic Cell Lines from Human Breast Tissue: The Aneuploid Mammary Epithelial

- (Hs578T) and the Diploid Myoepithelial (Hs578Bst) Cell Lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 58(6):1795-1806.
154. Bonner W A, Hulett H R, Sweet R G, Herzenberg L A (1972) Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*. 43(3):404-409.
 155. Herzenberg L A, Sweet R G, Herzenberg L A (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am*. 234(3):108-117.
 156. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 11(2):231-238.
 157. Kleiveland C R (2015) Peripheral blood mononuclear cells. 161-167. Verhoeckx, K., Cotter, P., Lopez-Exposito, I., Kleiveland, C., Lea, T., et al. *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer Copyright 2015
 158. Fuss I J, Kanof M E, Smith P D, Zola H (2009) Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 7:Unit7.1.
 159. Marques S M, Esteves da Silva J C (2009) Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*. 61(1):6-17.
 160. Sato S, Ono N, Steeber D A, Pisetsky D S, Tedder T F (1996) CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 157(10):4371-4378.
 161. Sato S, Steeber D A, Jansen P J, Tedder T F (1997) CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 158(10):4662-4669.
 162. Maldini C R, Ellis G I, Riley J L (2018) CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol*. 18(10):605-616.
 163. Gargett T, Brown M P (2014) The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol*. 5:235-235.
 164. Casucci M, Bondanza A (2011) Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirected T lymphocytes. *J Cancer*. 2:378-382.
 165. Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, et al. (2014) A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*. 124(8):1277-1287.
 166. Serafini M, Manganini M, Borleri G, Bonamino M, Imberti L, Biondi A, Golay J, Rambaldi A, Introna M (2004) Characterization of CD20-Transduced T Lymphocytes as an Alternative Suicide Gene Therapy Approach for the Treatment of Graft-Versus-Host Disease. *Human Gene Therapy*. 15(1):63-76.
 167. Wang X, Chang W-C, Wong C W, Colcher D, Sherman M, Ostberg J R, Forman S J, Riddell S R, Jensen M C (2011) A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 118(5):1255-1263.

168. Seitz M C, Mittelstaet J, Atar D, Hau J, Reiter S, Illi C, Kieble V, Engert D, Britta., Bender G, Krahl A-C, Knopf P, et al. (2021) Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting. *Oncoimmunology*.
169. Ma J S Y, Kim J Y, Kazane S A, Choi S-H, Yun H Y, Kim M S, Rodgers D T, Pugh H M, Singer O, Sun S B, et al. (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(4):E450-E458.
170. Porter D L, Hwang W-T, Frey N V, Lacey S F, Shaw P A, Loren A W, Bagg A, Marcucci K T, Shen A, Gonzalez V, et al. (2015) Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*. 7(303):303ra139-303ra139.
171. Scholler J, Brady T L, Binder-Scholl G, Hwang W-T, Plesa G, Hege K M, Vogel A N, Kalos M, Riley J L, Deeks S G, et al. (2012) Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med*. 4(132):132ra153-132ra153.
172. Gorovits B, Koren E (2019) Immunogenicity of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapeutics. *BioDrugs*. 33(3):275-284.
173. Dale G L, Gaddy P, Pikul F J (1994) Antibodies against biotinylated proteins are present in normal human serum. *J Lab Clin Med*. 123(3):365-371.
174. Seidel U J, Schlegel P, Grosse-Hovest L, Hofmann M, Aulwurm S, Pyz E, Schuster F R, Meisel R, Ebinger M, Feuchtinger T, et al. (2016) Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody. *Mol Ther*. 24(9):1634-1643.
175. Kiefer J D, Neri D (2016) Immunocytokines and bispecific antibodies: two complementary strategies for the selective activation of immune cells at the tumor site. *Immunol Rev*. 270(1):178-192.
176. Rodgers D T, Mazagova M, Hampton E N, Cao Y, Ramadoss N S, Hardy I R, Schulman A, Du J, Wang F, Singer O, et al. (2016) 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*. 113(4):E459-E468.
177. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn R C, Gavin B P, Kelderman S, Yu J, Scholler N, Powell D J, Jr. (2012) A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer research*. 72(7):1844-1852.
178. Koristka S, Cartellieri M, Feldmann A, Arndt C, Loff S, Michalk I, Aliperta R, von Bonin M, Bornhäuser M, Ehninger A, et al. (2014) Flexible Antigen-Specific Redirection of Human Regulatory T Cells Via a Novel Universal Chimeric Antigen Receptor System. *Blood*. 124(21):3494-3494.
179. Ponterio E, De Maria R, Haas T L (2020) Identification of Targets to Redirect CAR T Cells in Glioblastoma and Colorectal Cancer: An Arduous Venture. *Front Immunol*. 11:565631-565631.

180. Dees S, Ganesan R, Singh S, Grewal I S (2020) Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*.molcanther.0385.2020.
181. Yamamoto T N, Kishton R J, Restifo N P (2019) Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors. *Nat Med*. 25(10):1488-1499.
182. Li X, Ye F, Chen H, Lu W, Wan X, Xie X (2007) Human ovarian carcinoma cells generate CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from peripheral CD4(+)CD25(-) T cells through secreting TGF-beta. *Cancer Lett*. 253(1):144-153.
183. Chen L L, Ye F, Lu W G, Yu Y, Chen H Z, Xie X (2009) Evaluation of immune inhibitory cytokine profiles in epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 35(2):212-218.
184. Zhao X, Ye F, Chen L, Lu W, Xie X (2009) Human epithelial ovarian carcinoma cell-derived cytokines cooperatively induce activated CD4+CD25-CD45RA+ naive T cells to express forkhead box protein 3 and exhibit suppressive ability in vitro. *Cancer Sci*. 100(11):2143-2151.
185. Ninomiya S, Narala N, Huye L, Yagyu S, Savoldo B, Dotti G, Heslop H E, Brenner M K, Rooney C M, Ramos C A (2015) Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs. *Blood*. 125(25):3905-3916.
186. Zou W, Wolchok J D, Chen L (2016) PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med*. 8(328):328rv324.
187. Hu W, Zi Z, Jin Y, Li G, Shao K, Cai Q, Ma X, Wei F (2019) CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 68(3):365-377.
188. John L B, Devaud C, Duong C P, Yong C S, Beavis P A, Haynes N M, Chow M T, Smyth M J, Kershaw M H, Darcy P K (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19(20):5636-5646.
189. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R (2018) Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 6(1):8.
190. Moon E K, Carpenito C, Sun J, Wang L-C S, Kapoor V, Predina J, Powell D J, Jr., Riley J L, June C H, Albelda S M (2011) Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17(14):4719-4730.
191. Koneru M, O'Ceirbhail R, Pendharkar S, Spriggs D R, Brentjens R J (2015) A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer. *J Transl Med*. 13:102-102.
192. Calcinotto A, Grioni M, Jachetti E, Curnis F, Mondino A, Parmiani G, Corti A, Bellone M (2012) Targeting TNF-alpha to neoangiogenic vessels enhances lymphocyte infiltration in tumors and increases the therapeutic potential of immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 188(6):2687-2694.

193. Kuramitsu S, Ohno M, Ohka F, Shiina S, Yamamichi A, Kato A, Tanahashi K, Motomura K, Kondo G, Kurimoto M, et al. (2015) Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther.* 22(10):487-495.
194. Seip K, Jorgensen K, Haselager M V, Albrecht M, Haugen M H, Egeland E V, Lucarelli P, Engebraaten O, Sauter T, Maelandsmo G M, et al. (2018) Stroma-induced phenotypic plasticity offers phenotype-specific targeting to improve melanoma treatment. *Cancer Lett.* 439:1-13.
195. Cao Y, Rodgers D T, Du J, Ahmad I, Hampton E N, Ma J S Y, Mazagova M, Choi S-H, Yun H Y, Xiao H, et al. (2016) Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55(26):7520-7524.
196. Lohmueller J J, Ham J D, Kvorjak M, Finn O J (2017) mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology.* 7(1):e1368604-e1368604.
197. Lee Y G, Chu H, Lu Y, Leamon C P, Srinivasarao M, Putt K S, Low P S (2019) Regulation of CAR T cell-mediated cytokine release syndrome-like toxicity using low molecular weight adapters. *Nat Commun.* 10(1):2681-2681.
198. Kelemen L E (2006) The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer.* 119(2):243-250.
199. Tummers Q R J G, Hoogstins C E S, Gaarenstroom K N, de Kroon C D, van Poelgeest M I E, Vuyk J, Bosse T, Smit V T H B M, van de Velde C J H, Cohen A F, et al. (2016) Intraoperative imaging of folate receptor alpha positive ovarian and breast cancer using the tumor specific agent EC17. *Oncotarget.* 7(22):32144-32155.
200. Mankarious S, Lee M, Fischer S, Pyun K H, Ochs H D, Oxelius V A, Wedgwood R J (1988) The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med.* 112(5):634-640.
201. Hermanson D L, Kaufman D S (2015) Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity. *Front Immunol.* 6:195-195.
202. Klingemann H (2014) Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology.* 3:e28147-e28147.
203. Rahmani B, Patel S, Seyam O, Gandhi J, Reid I, Smith N, Khan S (2019) Current understanding of tumor lysis syndrome. *Hematological Oncology.* 37.
204. Miller J S, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney S A, Yun G H, Fautsch S K, McKenna D, Le C, Defor T E, Burns L J, et al. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 105(8):3051-3057.
205. Bachanova V, Cooley S, Defor T E, Verneris M R, Zhang B, McKenna D H, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lewis D, Hippen K, et al. (2014) Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood.* 123(25):3855-3863.

206. Hipp S, Tai Y T, Blanset D, Deegen P, Wahl J, Thomas O, Rattel B, Adam P J, Anderson K C, Friedrich M (2017) A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo. *Leukemia*. 31(8):1743-1751.
207. Deisting W, Raum T, Kufer P, Baeuerle P A, Münz M (2015) Impact of Diverse Immune Evasion Mechanisms of Cancer Cells on T Cells Engaged by EpCAM/CD3-Bispecific Antibody Construct AMG 110. *PLoS one*. 10(10):e0141669-e0141669.
208. Fiedler W M, Wolf M, Kebenko M, Goebeler M-E, Ritter B, Quaas A, Vieser E, Hijazi Y, Patzak I, Friedrich M, et al. (2012) A phase I study of EpCAM/CD3-bispecific antibody (MT110) in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 30(15_suppl):2504-2504.
209. Reusch U, Burkhardt C, Fucek I, Le Gall F, Le Gall M, Hoffmann K, Knackmuss S H J, Kiprijanov S, Little M, Zhukovsky E A (2014) A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells. *MAbs*. 6(3):728-739.
210. Lee H Y, Contreras E, Register A C, Wu Q, Abadie K, Garcia K, Wong P Y, Jiang G (2019) Development of a bioassay to detect T-cell-activating impurities for T-cell-dependent bispecific antibodies. *Sci Rep*. 9(1):3900-3900.
211. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou R C, Topp M S, Gökbuget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, et al. (2012) Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 119(26):6226-6233.
212. Guram K, Kim S S, Wu V, Sanders P D, Patel S, Schoenberger S P, Cohen E E W, Chen S-Y, Sharabi A B (2019) A Threshold Model for T-Cell Activation in the Era of Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Front Immunol*. 10:491.
213. Caruso H G, Hurton L V, Najjar A, Rushworth D, Ang S, Olivares S, Mi T, Switzer K, Singh H, Huls H, et al. (2015) Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer research*. 75(17):3505-3518.
214. Hudecek M, Lupo-Stanghellini M-T, Kosasih P L, Sommermeyer D, Jensen M C, Rader C, Riddell S R (2013) Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19(12):3153-3164.
215. Walker A J, Majzner R G, Zhang L, Wanhainen K, Long A H, Nguyen S M, Lopomo P, Vigny M, Fry T J, Orentas R J, et al. (2017) Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 25(9):2189-2201.
216. Watanabe K, Terakura S, Martens A C, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, et al. (2015) Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 194(3):911-920.
217. Hombach A A, Schildgen V, Heuser C, Finnern R, Gilham D E, Abken H (2007) 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. *The Journal of Immunology*. 178(7):4650.
218. Byrd T T, Fousek K, Pignata A, Szot C, Samaha H, Seaman S, Dobrolecki L, Salsman V S, Oo H Z, Bielamowicz K, et al. (2018) TEM8/ANTXR1-Specific CAR T Cells as a Targeted Therapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer research*. 78(2):489-500.
 219. Seitz C M, Schroeder S, Knopf P, Krahl A-C, Hau J, Schleicher S, Martella M, Quintanilla-Martinez L, Kneilling M, Pichler B, et al. (2020) GD2-targeted chimeric antigen receptor T cells prevent metastasis formation by elimination of breast cancer stem-like cells. *Oncoimmunology*. 9(1):1683345.
 220. Perna F, Berman S H, Soni R K, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, Hendrickson R C, Brennan C W, Sadelain M (2017) Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell*. 32(4):506-519.e505.
 221. Berger M (2013) Adverse Effects of IgG Therapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 1(6):558-566.
 222. Pettit S J, Bourne H, Spickett G P (2002) Survey of infection in patients receiving antibody replacement treatment for immune deficiency. *J Clin Pathol*. 55(8):577-580.
 223. Xu X-J, Song D-G, Poussin M, Ye Q, Sharma P, Rodríguez-García A, Tang Y-M, Powell D J (2016) Multiparameter comparative analysis reveals differential impacts of various cytokines on CART cell phenotype and function ex vivo and in vivo. *Oncotarget*. 7(50):82354-82368.
 224. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, et al. (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer research*. 65(2):465-472.
 225. Rosenberg S A, Yang J C, Restifo N P (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 10(9):909-915.
 226. Andtbacka R H, Kaufman H L, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman K A, Spitler L E, Puzanov I, Agarwala S S, et al. (2015) Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 33(25):2780-2788.
 227. Mahoney K M, Rennert P D, Freeman G J (2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov*. 14(8):561-584.
 228. Gajewski T F, Schreiber H, Fu Y-X (2013) Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*. 14(10):1014-1022.
 229. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 5(4):263-274.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, in der Abteilung: Hämatologie/Onkologie unter der Betreuung von Dr. med. P. Schlegel, Dr. med. C. Seitz und Prof. Dr. med. P. Lang durchgeführt.

Die wissenschaftliche Studie wurde von Dr. med. P. Schlegel und Dr. med. C. Seitz konzipiert und geleitet. Alle Experimente wurden von mir unter Anleitung eigenständig geplant, vorbereitet und durchgeführt (mit gelegentlicher Unterstützung von Stefanie Zug). Ihre Auswertung und graphische Darstellung erfolgten nach Anleitung durch Dr. med. Patrick Schlegel eigenständig.

Die Dissertationsarbeit habe ich selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2021 bei Onkoimmunology publiziert und sind entsprechend gekennzeichnet. Es handelt sich hierbei um die wissenschaftliche Publikation von Seitz, Mittelstaet, Atar, Hau, Reiter, Illi *et al.* - Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben: Prof. Dr. med. P. Lang, Dr. med. P. Schlegel und Dr. med. C. Seitz für die fachliche Betreuung während der experimentellen Forschung und bei der schriftlichen Ausarbeitung der Ergebnisse. Prof. Dr. med. R. Handgretinger danke ich für die freundliche Aufnahme in die Forschungsabteilung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Dr. med. P. Schlegel danke ich insbesondere für das unerschöpfliche, geduldige und enthusiastische Engagement bei der Umsetzung sowie für die ansteckende Motivation und Begeisterungsfähigkeit für die klinische Bedeutung der Forschung und die anhaltende Zuversicht in Zeiten von Rückschlägen. Er ermöglichte mir einen enormen theoretischen und praktischen Wissenszuwachs.

Selina Reiter danke ich herzlich für die ausführliche praktische Einarbeitung, Stefanie Zug für die verlässliche Hilfe und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, Florian Heubach für die geduldige und kompetente Einführung in die Durchführung und Auswertung von Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassays, Stefan Grote und anderen Kolleginnen und Kollegen möchte ich für die Diskussionen, Anregungen und die Unterstützung bei der Lösung neuer Fragestellungen danken. Ich habe die Zeit im Labor sehr genossen, denke gerne daran zurück und bedanke mich bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsabteilung für eine freundliche Atmosphäre im Labor und die kollegiale Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei meinen Freundinnen und Freunden, meinen Mitbewohnerinnen und Mitbewohnern für die unerlässliche Unterstützung, ihr Verständnis und die unvergessliche Studienzeit bedanken!

Zuletzt möchte ich insbesondere meinen Eltern danken, die mich durch mein Leben begleiten und mich bei meinen Entscheidungen unentwegt unterstützen.